

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Modifications enzymatiques des superoxyde dismutases au cours de la senescence des fibroblastes WI-38 en culture

Somville, Michel

Award date:
1982

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur

Laboratoire de Biochimie Cellulaire

Professeur J. REMACLE

***MODIFICATIONS ENZYMATIQUES DES SUPEROXYDE DISMUTASES
AU COURS DE LA SENESCENCE
DES FIBROBLASTES WI-38 EN CULTURE***

Dissertation présentée pour l'obtention
du grade de Docteur en Sciences

Michel SOMVILLE

- 1982 -

FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

Bibliothèque

FTB

3/1982/2

FT B3/1982/2



Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur

Laboratoire de Biochimie Cellulaire

Professeur J. REMACLE

***MODIFICATIONS ENZYMATIQUES DES SUPEROXYDE DISMUTASES
AU COURS DE LA SENESCENCE
DES FIBROBLASTES WI-38 EN CULTURE***

Dissertation présentée pour l'obtention
du grade de Docteur en Sciences

Michel SOMVILLE



Université de Bordeaux
Bibliothèque de la Faculté de Sciences
Bordeaux-Mérignac

MODIFICATION ENZYMATIQUE DES SUPEROXYDES DISMUTASES
69803 2743696
69803

Document présenté pour l'obtention
du grade de Docteur en Sciences

MICHEL SCHWARTZ

*A mon grand-père,
à Brigitte et Vincent.*

*" add life into years and not
years into life."*

Je voudrais remercier monsieur J.REMACLE qui a accepté d'être le promoteur de ma thèse. Il a été pour moi plus qu'un promoteur. Au-delà du travail scientifique, c'est toute une amitié qui s'est tissée entre nous.

Je me dois de remercier :

Le Docteur H.NOHL qui m'a appris à Munich , les techniques de dosages qui forment la base indispensable de ce travail.

Messieurs V.NZINGULA et E.SCHONNE qui m'ont accepté et entouré de leurs conseils au laboratoire d'embryologie de Louvain-la-Neuve.

Monsieur E.FEYTMANS qui m'a profondément stimulé et conseillé dans l'analyse des résultats et la rédaction finale de la thèse. Qu'il soit remercié pour sa très grande disponibilité et son amitié.

Messieurs J.DELCOUR et J.VANDENHAUTE pour leur présence, leurs propositions critiques et toujours constructives.

Mes remerciements vont également à mesdames et messieurs :

A.HOUBION, F.MBEMBA, E.DELAIVE, M.RAES, A.HOUBEN, F.MAIFERME, F. DUBOIS, J-P.LEBLOND, MARIE et madame ANGELE, G.LENOIR, E.DEVRESSE, I.HEINE, B.LOTIN, E.DEPIEREUX , J-M.GOHY, et tout spécialement aux

*amis du C.R.U..Tous m'ont entouré de leurs conseils et de leur
amitié.*

Au Père J.BERLEUR s.j. pour ses solidarités, son amitié fidèle.

*Nos paroles et silences nous unissent dans une complicité profon-
de de coeur.*

A BRIGITTE et VINCENT , par amour.

*Je voudrais enfin remercier l'I.R.S.I.A. et les
Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix qui m'ont assisté
financièrement et m'ont permis de mener à bien cette recherche.*

NAMUR , le 6 avril 1982.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I	<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	1.
1.1	Considérations générales.....	2.
1.2	Sénescence et déterminisme.....	2.
1.2.1	Théorie des mutations somatiques.....	4.
1.2.2	Théorie de "l'erreur catastrophique".....	7.
1.3	Sénescence et environnementalisme.....	12.
1.3.1	Résultats sur les modifications enzymatiques.....	13.
1.3.2	Altérations chimiques et protéines modifiées.....	22.
1.3.3	Changements conformationnels et protéines modifiées.../	23.
CHAPITRE II	<u>APPROCHE DU VIEILLISSEMENT PAR LE MECANISME DE DEFENSE</u>	
	<u>DE LA CELLULE CONTRE L'OXYGENE</u>	29.
2.1	Toxicité de l'oxygène.....	30.
2.2	Oxygène et radical superoxyde.....	31.
2.3	Propriétés générales et sources biologiques des radicaux superoxydes.....	33.
2.4	Cytotoxicité des radicaux superoxydes.....	36.
2.5	Les superoxyde dismutases.....	39.
2.5.1	Evolutions et distributions des superoxyde dismu- tases.....	42.
2.5.2	Propriétés physico-chimiques et mécanisme cataly- tique.....	46.
2.6	Mécanisme de défense de la cellule contre l'oxygène.....	50.
2.7	Sénescence et défense de la cellule contre l'oxygène.....	63.
2.7.1	Lipofuscine et vieillissement.....	63.
2.7.2	Comportements enzymatiques.....	66.

CHAPITRE III RESULTATS

71.

3.1 Bases historiques de la culture de cellules.....	72.
3.2 Techniques de culture des fibroblastes WI-38.....	75.
3.3 Technique et résultats du dosage des radicaux libres.....	77.
3.4 Analyse de la superoxide dismutase (SOD).....	80.
3.4.1 Dosage de la SOD.....	80.
3.4.2 Courbe de pH.....	82.
3.4.3 Courbe de température.....	83.
3.4.4 Dosage de la SOD dans les cellules WI-38.....	83.
3.4.5 Mise en évidence de la SOD cytoplasmique et mitochondriale dans les cellules WI-38.....	87.
3.4.6 Activité des superoxyde dismutases présentes.....	95.
chez les cellules WI-38 jeunes et vieilles.....	95.
3.4.7 Fractionnement des cellules par centrifugation différentielle.....	96.
3.5 Etudes des modifications enzymatiques de la SOD liées au vieillissement des fibroblastes WI-38 en culture.....	100.
3.5.1 Comportement thermosensible des SOD de fibro- blastes WI-38.....	100.
3.5.2 Comportement immunologique des SOD de fibroblastes WI-38.....	105.
3.6 Facteurs influençant la présence ou l'absence d'enzyme modifiée.....	109.
3.6.1 Purification des anticorps anti-SOD.....	110.
3.6.2 Impact comparé de l'environnement cytoplasmique jeune et vieux sur la forme SOD thermolabile.....	112.
3.7 Caractéristiques de l'enzyme modifiée.....	121.
3.7.1 Caractéristiques de la SOD-Cu Zn (pure) modifiée artificiellement.....	121.
3.7.2 Caractéristiques de la SOD-Cu Zn cytoplasmique des fibroblastes WI-38 (g29-g30 et g51-g52) en culture.....	133.

3.8 Etude de différents facteurs affectant la SOD-Cu Zn modifiée.....	142.
3.8.1 Facteurs affectant la SOD-Cu Zn modifiée artifi- ciellement.....	142.
3.8.2 Facteurs influençant la SOD-Cu Zn modifiée "in vivo"..	144.
 CHAPITRE IV <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	 157.
CHAPITRE V <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	161.
<u>LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE</u>	203.

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE

*"A theory is a species of
thinking, and its right to
exist is coextensive with
its power of resisting
extinction by its rivals"*

(T. H. HUXLEY, "Science and
culture" - 1888)

1.1 Considérations générales

On peut définir la sénescence comme un processus évolutif irréversible qui accentue au cours de l'âge chronologique la probabilité de dysfonctionnement de l'organisme par des modifications fonctionnelles des structures moléculaires, sub-cellulaires, cellulaires, tissulaires, et finalement, de celles des organes.

Cette définition fait apparaître la complexité et la dynamique du phénomène, mais aussi le découpage du phénomène en plans moléculaires, cellulaires, tissulaires... et donne lieu à l'émergence de multiples théories que l'on peut regrouper en deux modèles principaux. Nous allons envisager globalement ces deux modèles avant de les analyser en détail par la suite.

Le premier pose le vieillissement comme déterminé génétiquement : une "horloge interne" règle la durée de vie d'un individu ou d'une espèce donnée. Les sites de changements liés au vieillissement sont d'abord localisés au niveau des gènes dont la modification aura pour résultante : l'apparition de protéines et d'enzymes modifiées, la détérioration des structures subcellulaires, la moindre efficacité de la régulation homéostasique et des mécanismes de défenses cellulaires etc. Dans cette optique, les changements structurels et de régulation sont dus initialement à des modifications dans le fonctionnement et l'organisation du génome.

Le deuxième présente le vieillissement comme résultant de modifications qui ne seraient pas liées au génome, mais plutôt à un environnement cellulaire particulier, sorte de modifications post-traductionnelles affectant notamment le niveau enzymatique de la cellule. L'organisme subit de multiples dommages aléatoires, ponctuels, dont l'accumulation jusqu'à un seuil intolérable provoque la mort cellulaire, tissulaire, et enfin, celle de l'organisme.

Ces deux modèles stimulent largement le milieu scientifique concerné, mais nous semblent trop souvent présentés en des termes de rivalités aiguës. Ni l'un ni l'autre ne peut aujourd'hui faire sien l'ensemble des observations et expériences réalisées sur la sénescence : les syndromes de Werner et de Progeria caractérisés par une sénilité précoce, la culture de cellules limitée dans le temps (en fonction du type de souches et l'âge du donneur) appuient la thèse d'un déterminisme génétique alors que les altérations moléculaires d'enzymes particulières dans différents organes ou cellules en culture semblent résulter d'une action du milieu. Pour notre part, nous pensons que déterminisme et usure du système sont les expressions partielles d'un même phénomène dont le processus global ne sera mis à jour qu'à la condition de considérer ces observations comme complémentaires.

1.2 Sénescence et déterminisme

On peut dégager deux caractéristiques universelles des métazoaires supérieurs :

1. tous ces organismes présentent un déclin graduel d'adaptation à un environnement normal qui se manifeste très rapidement
2. tous les membres d'une même espèce ont un temps de vie fixé dont la variabilité pour des animaux en bonne santé est relativement faible.

Ces deux caractéristiques apparaissent comme héritées et génétiquement contrôlées. De même, la période qui précède la maturité productive est identique pour une même espèce.

Il nous faut donc émettre l'hypothèse qu'il existe pour chaque individu un programme génétique capable d'assurer ces déterminismes.

Les nombreuses théories qui envisagent une explication déterministe au vieillissement proposent le gène comme site fondamental d'un changement qui initialise le processus de sénescence. Les facteurs extérieurs de "stress", nourriture, etc. influencent quant à eux, la cinétique du processus. Ainsi, les théories basées sur l'observation de changements, comme les modifications

- enzymatiques, hormonales
- de la perméabilité membranaire
- de l'intégrité des structures sub-cellulaires
- de l'homéostasie ou le "cross-linking"

des macromolécules et l'apparition de lipofuscine, privilégient-elles en fait, la nature secondaire de ces modifications, le processus initial étant localisé au niveau du génome.

Avant de passer à la présentation des théories "déterministes" les plus importantes, il faut encore insister sur le fait que si l'on montre que le maximum d'espérance de vie chez les individus d'une même espèce est fixé, très peu de ces individus atteignent ce maximum. L'environnement naturel et les facteurs intrinsèques aléatoires jouent le rôle de distracteurs capables d'altérer le programme du vieillissement en le court-circuitant.

Ceci explique entre autres, la difficulté des chercheurs à distinguer ce qui compose le "programme" et ce qui en altère la cinétique, les séquences symptomatiques et provoque son arrêt.

1.2.1 Théorie des mutations somatiques

Les observations réalisées par Ross et Scott (1939) sur des rats irradiés très faiblement ont montré que ceux-ci voyaient leur espérance de vie baisser très fortement. Cette observation et bien d'autres encore, conduisirent Szilard (1959 a, 1959 b)

à proposer la théorie des "mutations somatiques" comme modèle explicatif du vieillissement. Cette théorie présente les mutations "provoquées" ou "spontanées" comme autant d'agressions destructrices des gènes et des chromosomes dans les cellules post-mitotiques. Pendant la vie de l'organisme, celui-ci voit progressivement sa charge en mutations croître, l'efficacité des gènes affectée et la production de protéines fonctionnelles décroître d'autant. La mort survient lorsque la charge de mutations atteint un seuil critique à la cellule et finalement à l'organisme entier.

Saksela et Moorhead (1963) et Thompson et Holliday (1975) ont en effet mis en évidence une augmentation de l'aneuploïdie et des aberrations chromosomiques chez les vieilles cellules en culture. La mutagenèse engendrée par des radiations ionisantes accélère le vieillissement des fibroblastes de poulet, mais non ceux de l'homme (Macieira - Coelho et al. 1976).

Curtis (1965) précisera que les dommages causés par les radiations ionisantes sont plus néfastes aux cellules post-mitotiques et moins aux pré-mitotiques. Les premières accumulent les effets mutagènes sans disposer d'aucun moyen d'élimination par les divisions, les dernières étant éliminées et remplacées par d'autres cellules saines.

Cependant, aucune preuve n'indique que ces mutations sont la cause du vieillissement ou au contraire un effet des modifications survenant au niveau d'autres processus cellulaires (comme la synthèse des protéines). La DNA polymérase pourrait en effet introduire de telles mutations (Linn et al. 1976).

Les observations effectuées sur des fibroblastes de poumon d'embryons humains (lignée MRC-5), traités avec de la colchicine pendant 3 à 6 heures, montrent que la population cellulaire

survivante est à 60 % tétraploïde et continue à se diviser pendant un temps identique aux cellules diploïdes dont elles dérivent. Si l'accumulation de mutations et de modifications était la cause de leur mort, alors, les cellules tétraploïdes devraient présenter une résistance plus grande et une vie plus longue, ce qui n'est pas le cas (Thompson et Holliday 1978; Hoehn et al. 1975).

Dans un article de revue sur la théorie des mutations, Sinex (1974) expose d'autres paradoxes de cette théorie. Ainsi, si les dommages imputés aux radiations ionisantes sont identiques à ceux liés au vieillissement normal, alors, les espèces à vie longue seront plus résistantes aux radiations. Ce n'est pas ce que l'on observe, en effet : l'approximation des L.D.₅₀ pour l'homme, la souris, le rat, la drosophile et la paramécie sont respectivement de 450, 550, 750, 64.000 et 300.000 Roëntgens. Il n'y a donc pas de corrélation entre sensibilité aux radiations et longévité. La drosophile et la paramécie ont une vie courte, mais une résistance élevée; l'homme dont la résistance est faible vit, plus ou moins, une septantaine d'années.

Selon Kanungo (1980), les radiations ionisantes n'accélèrent pas le vieillissement, mais induisent plutôt une mort précoce en augmentant la probabilité d'apparition de cancer ou d'autres processus "non-spécifiques" au vieillissement relevant des syndromes de radiations et non liés à la sénescence naturelle.

Enfin, des études portant sur les mécanismes de réparation des altérations survenues au DNA montrent que plus la cellule dérive d'une espèce à vie longue et plus son mécanisme de réparation est efficace. De même, celui-ci perd de son efficacité en fonction de l'âge de la culture (Price et al. 1971).

Les fibroblastes dérivant d'individus atteints du syndrome de Progeria montrent un faible potentiel de division mais aussi une diminution de leur capacité de réparer les dommages du DNA causés par des traitements aux Rayons X (Epstein et al. 1973). Par contre, la capacité de réparer le DNA chez les fibroblastes normaux ne décroît qu'à l'extrême limite de la vie des cellules. Ce phénomène ne trouverait donc son explication que par l'apparition préalable d'autres modifications tendant toutes, "in fine", à la mort cellulaire.

Les causes et conséquences des perturbations cellulaires évoquées ici ont sans nul doute un impact sur la sénescence. Il semble cependant évident que le vieillissement ne puisse pas trouver d'explications globales s'il ne prend en considération que les mutations somatiques provoquées ou spontanées (Comfort 1979; Sinex 1974; Kanungo 1980).

1.2.2 Théorie de "l'erreur catastrophique"

Comme nous l'avons souligné dans notre introduction, si la sénescence se marque par des altérations géniques, celles-ci doivent se manifester également sur les protéines. Ainsi, de nombreuses études ont été effectuées pour caractériser la sénescence cellulaire sur le plan morphologique et biochimique. Ce dernier plan, très riche en observations, a montré l'existence de très nombreuses protéines modifiées, altérées, inactivées ou partiellement inactivées dont la genèse est liée à la sénescence (Wilson 1981). Les unes, à faible taux de renouvellement, favorisent l'hypothèse d'une origine aléatoire dans ces modifications dont l'émergence serait liée à l'accumulation progressive d'agressions diverses du milieu. Les autres, à renouvellement élevé, peuvent difficilement rendre compte de cette hypothèse;

la constance de leur synthèse implique l'existence de modifications à un niveau plus fondamental : celui des mécanismes de leur production.

Les possibilités explicatives de ce dernier point sont triples : soit, la cellule utilise des blocs d'informations différents pour synthétiser ses protéines soit, le contenu génétique originel est modifié irréversiblement par des mutations somatiques au hasard (cfr ci-dessus) soit, l'accumulation d'altérations protéiques est liée au mauvais fonctionnement des mécanismes de transfert de l'information génétique. C'est en 1963 qu'Orgel (Orgel 1963) proposa cette troisième alternative, clé de voûte d'un édifice théorique remarquable dont la proposition consiste à remarquer parmi les altérations aléatoires qui affectent la structure protéique, celles qui touchent les enzymes participant elles-mêmes à l'expression de l'information. Ainsi, l'incorporation de nucléotides erronés dans les mRNAs pendant la transcription, ou l'incorporation d'acides aminés erronés dans les protéines et particulièrement celles liées à l'expression génétique, conduit automatiquement à une amplification de ces erreurs par rétroaction, à leur auto-propagation et à l'augmentation d'enzymes ou de protéines défectueuses. Ce processus conduit à la sénescence et la mort cellulaire selon le mode de "l'error catastrophe theory". Il faut cependant remarquer que l'incorporation d'erreurs dans des protéines des chaînes métaboliques ne peut être dangereuse si ces enzymes ont une demi-vie courte. Si par contre, une erreur est introduite dans les RNA polymérases ou les amino-acyl - tRNA synthétases, elle conduira inmanquablement à l'incorporation d'erreurs et donc de mauvais acides aminés dans toutes les protéines synthétisées par la cellule. Cette théorie postule donc que la fidélité ou la précision de la machinerie de transfert de

l'information n'est pas absolue. Plus tard, Orgel (1970) modifia sa théorie en suggérant, à côté du mécanisme décrit, la possibilité pour la cellule d'éviter le caractère inéluctable de l'évolution exponentielle d'erreurs. Ainsi, en supposant que la première génération de synthèse protéique est vierge de toute erreur au niveau des t-RNA synthétases, des ribosomes, etc., et assumant le caractère non absolu de la fidélité de transcription, la seconde génération acquerra quelques erreurs; la cellule engendrera des protéines erronées qui accentueront les erreurs dans la troisième génération de l'appareil de synthèse, etc. Si ce processus continue, deux voies se présentent : l'une conduisant à une fréquence d'erreurs de plus en plus grande et à la catastrophe, l'autre, à une fréquence d'erreurs convergeant vers une valeur non nulle stable où le processus de vieillissement ne se manifeste pas ou peu. Ainsi, Orgel (1973) précise que des cellules peuvent produire un appareil de synthèse plus fiable si les protéines altérées sont détruites par des enzymes adéquates.

Le résultat final est la stabilisation de la fréquence d'erreurs à un niveau peu élevé et tolérable.

Sans être formellement démontrée, la théorie d'Orgel a le mérite d'avoir suscité un nombre considérable de travaux qui ont enrichi nos connaissances sur les changements qualitatifs et quantitatifs s'opérant dans les protéines ou dans les mécanismes de traduction au cours du vieillissement.

Il existe des arguments expérimentaux favorables (Lewis et arrant 1972; Holliday et Tarrant 1972) et opposés (Holland et al. 1973, Gershon 1979, Rothstein 1979) à la théorie de l'erreur catastrophique, mais tirés d'études indirectes sur la fidélité de synthèse protéique sénescence; récemment, Wojtyk et Goldstein (1980) ont

développé un "cell-free protein synthesizing system" à partir de fibroblastes humains en culture dérivant de donneurs normaux ou atteints des syndromes de Werner ou de progeria qui montre par une approche directe que :

1. la fidélité de synthèse protéique chez des fibroblastes normaux n'est pas altérée en fonction de l'âge de la culture.
2. les cellules de donneurs âgés ne présentent pas une fréquence d'erreur traductionnelle significativement élevée.
3. les extraits fibroblastiques de donneurs atteints des syndromes de vieillissement prématuré présentent une fréquence d'erreur identique aux cellules normales.
4. la lignée transformée sv40-MRC 5 ne présente pas une fréquence d'erreur plus faible que la lignée d'origine MRC 5.

Ces résultats, confirmés par les travaux de Harley et al. (1980) sur des fibroblastes humains en culture sont donc en contradiction avec les bases mêmes de la théorie d'Orgel et son corollaire qui veut que des lignées transformées (cancéreuses) présentent une fréquence d'erreur plus faible que les lignées parentales normales.

Cependant, d'autres résultats sur des tissus eucaryotiques, obtenus par les mêmes techniques, montrent que la fidélité traductionnelle s'accroît (Kurtz 1975), devient plus faible (Mariotti et Ruscitto 1977), ou ne change pas significativement (Mori et al. 1979, Yang et al. 1977) chez des animaux âgés.

Tout en réfutant l'hypothèse d'Orgel, Wojtyk et Goldstein (1980) estiment qu'une protéine de 300 acides aminés a 74 % de chance d'être synthétisée correctement ; les 26 % de protéines altérées seraient compatibles avec la survie cellulaire si l'on rejoint l'hypothèse d'un mécanisme protéolytique efficace capable d'identifier et de dégrader ces protéines aberrantes (Goldberg et St John 1976).

D'autre part, il convient de souligner que le modèle de rétro-action d'Orgel exige que les modifications qui apparaissent dans les protéines au cours du vieillissement correspondent effectivement à des changements de leur séquence d'acides aminés. Or, cette relation est difficile à démontrer et largement controversée aujourd'hui (cfr alinéa 1-3).

De plus, si effectivement la théorie généralisée d'Orgel explique les causes de la sénescence cellulaire, pourquoi les cellules germinales n'accumulent pas d'erreurs? Cette question mise en avant par Orgel lui-même (Orgel 1973) voit une partie de la réponse proposée par l'existence d'un contrôle de qualité opérationnel pendant l'oogenèse et les premiers stades du développement embryonnaire. Ce contrôle rejeterait les œufs et embryons à trop haut niveau d'erreurs. La question se repose alors de savoir si ce contrôle existe et pourquoi un tel mécanisme arrête de fonctionner une fois que le développement fœtal est atteint ?

Nous constatons combien cette théorie est séduisante, mais aussi combien de contradictions et de questions elle laisse sans réponse. Ainsi, si nous pensons qu'un axe déterministe sous-tend la phénoménologie du vieillissement, celle-ci nous semble modulée par d'autres facteurs biologiques que nous développerons ci-dessous dans le cadre des théories environnementalistes.

1.3 Sénescence et environmentalisme

L'attention portée à la théorie d'Orgel a conduit à l'émergence d'une hypothèse nouvelle qui se focalise essentiellement sur l'analyse et l'explication des modifications post-traductionnelles affectant les enzymes. Dans le cas de cellules dont la synthèse est active quel que soit l'âge de l'organisme, les protéines peuvent être altérées à partir d'événements traductionnels ou post-traductionnels.

La synthèse fautive est un corollaire de la théorie de l'erreur catastrophique. Ainsi, des molécules protéiques altérées doivent apparaître avec l'âge et donc présenter des activités catalytiques réduites par unité de protéine purifiée ou par unité antigénique de l'enzyme. De même, ces molécules altérées sont le résultat d'une synthèse protéique erronée et donc d'incorporations aléatoires incorrectes d'acides aminés pendant leur synthèse "de novo". Tout cela doit conduire à l'existence pour une même enzyme de molécules d'activité catalytique complète, partielle et nulle. En effet, les modifications d'acides aminés peuvent affecter le site actif, la fixation du cofacteur ou d'autres sites moins importants pour l'activité catalytique. De plus, les enzymes modifiées (altérées) participent elles-mêmes au mécanisme de propagation en chaîne des erreurs de traduction. Enfin, si la constante de proportionnalité entre erreurs dans l'appareil de synthèse et erreurs dans les protéines fraîchement synthétisées est supérieure à 1, l'évolution exponentielle de synthèse de molécules aberrantes conduira à la catastrophe finale. Orgel n'a cependant pas spécifié quel niveau d'activité enzymatique altéré était catastrophique pour la cellule.

Avant d'entrer dans le développement des arguments expérimentaux de cette hypothèse, on rappellera que les critères de modification d'enzymes chez des cellules ou des organismes âgés sont nombreux et incluent particulièrement, (1) la stabilité thermique, (2) les modifications de charge ou de point isoélectrique, (3) les altérations des propriétés cinétiques, (4) les modifications de l'activité d'une enzyme rapportée au nombre de molécules ou au nombre d'antigènes. Ce dernier point correspond au rapport entre activité enzymatique et réactivité immunologique; il décroît lorsqu'une enzyme devient complètement ou partiellement inactive sans avoir pour autant perdu sa capacité de réagir avec des anticorps spécifiques.

1.3.1 Résultats sur les modifications enzymatiques

Un grand nombre de caractéristiques enzymatiques ont été étudiées au cours du vieillissement : le pH optimum d'activité, la mobilité électrophorétique, la composition en acides aminés, le poids moléculaire, l'affinité pour le substrat etc. (Gershon et Gershon 1973; Reiss et Rothstein 1975; Gupta et Rothstein 1976 a, 1976 b; Reiss et Gershon 1976 b; Sharma et al. 1976 a; Goren et al. 1977; Menecier et Dreyfus 1974; Dreyfus et al. 1977).

Ces propriétés ne semblent pas ou peu modifiées aux cours du vieillissement. Cependant, il en est trois qui se dégagent particulièrement et semblent faire partie de la stratégie d'étude du vieillissement enzymatique (Houben 1981), ce sont :

1. le comportement enzymatique à haute température,
2. l'apparition d'une fraction "matériel à réaction croisée"(CRM),
3. l'activité spécifique plus ou moins déficitaire chez les organismes vieux.

Les tableaux 1 et 2 reprennent ces trois types de modifications associées à l'étude spécifique des superoxyde dismutases cytoplasmiques (tableau 1) et mitochondriales (tableau 2).

Le tableau 3 présente ces modifications associées à des enzymes étudiées sur le modèle de cellules en culture.

Commentaires tableaux 1 et 2.

D'une manière générale, l'étude de la thermolabilité de la SOD cytoplasmique et mitochondriale a été très peu réalisée, mais montre que seule la SOD cytoplasmique présente une thermolabilité accrue par rapport à la SOD cytoplasmique jeune.

L'analyse du matériel à réaction croisée (CRM) présente une hétérogénéité de résultats (apparition de CRM) entre espèces. Cependant, pour une même espèce, les résultats sont cohérents et indiquent une apparition de CRM de la superoxyde dismutase cytoplasmique (souris, rats, fibroblastes WI-38) en fonction de l'âge.

Quant à l'activité spécifique, la superoxyde dismutase mitochondriale et la majorité des études réalisées sur la superoxyde dismutase cytoplasmique (16 études/21) montrent qu'il n'y a pas d'évolution particulière. Il faut cependant remarquer que les 5 études restantes indiquent des pertes d'activités spécifiques de l'ordre de 37,5 % (Glass et Gershon 1981), 36 % (Massie et al. 1979), 55 % (Reiss et Gershon 1976 a) et 60 % (Reiss et Gershon 1976 b) par rapport à l'activité spécifique "jeune".

Enfin, il semblerait qu'il existe un lien entre une thermolabilité accrue et l'apparition de matériel à réaction croisée (Reiss et Gershon 1976 a, 1976 b ; Somville et Remacle 1980 ; Dovrat et Gershon 1981).

Superoxyde dismutase cytoplasmique

Espèce	Matériel	Modifications				Références.
		Ages	Th.*	A.S. ^Δ	U [○]	C.R.M.●
Drosophile adulte Souris	Homogénat total	1-42 j.		0	(1)	Massie et al., 1981
	foie. extrait cellulaire	3-24 m.		0	(2)	Burrows et Davison, 1980
	foie. Homogénat	8-28 m.		-	(2)	Reiss et Gershon, 1976 a
	cœur. "	"		0	"	"
	cerveau. "	"		0	"	"
Rat	cerveau. "	"		-	(2)	Massie et al., 1979
	foie. Homogénat	13-26 m.		0	(2)	Kellogg et Fridovich, 1976
	cerveau. "	"		0	"	"
	foie. "	8-32 m.	+	-	(2)	Reiss et Gershon, 1976 a
	cerveau. "	"		0	"	"
Chien	cœur. "	"		0	"	"
	foie. SOD purifiée	6-27 m.	+	-	(2)	Reiss et Gershon, 1976 b
	globules rouges	6-28 m.		-	(3)	Glass et Gershon, 1981
	foie. extrait cellulaire	2-12 a.		0	(2)	Burrows et Davison, 1980
	fibroblastes WI-38			0	(2)	Yamanaka et Deamer, 1974
Homme	fraction cytoplasmique		+	0	(2)	Somville et Remacle, 1980
	"			0	(2)	
	cellules peau GM-275	50 a.		0	(2)	Duncan et al., 1979
	fraction cytoplasmique	20-80 a.		0	(4)	Stevens et al., 1975
	globules rouges	1-98 a.		0	(5)	Joenje et al., 1978
Homme (syndrome de Werner)	globules rouges	38 a.		0	(2)	Marklund et al., 1981
	lymphocytes	"		0	"	"

Tableau I Modifications enzymatiques liées à la superoxyde dismutase cytoplasmique en fonction du vieillissement d'espèces différentes.

* thermolabilité

Δ activité spécifique

● matériel à réaction croisée

○ unités : (1) par mg poids frais, (2) par mg protéines, (3) par cellule, (4) par volume sanguin total, (5) par g d'hémoglobine.

+ augmentation, 0 pas de différence et - diminution de l'activité avec le vieillissement.
j. jour, m. mois, a. année.

Superoxyde dismutase mitochondriale

<u>Espèce</u>	<u>Matériel</u>	<u>Modifications</u>				<u>Références</u>
		<u>Âges</u>	<u>Th.*</u>	<u>A.S.Δ</u>	<u>O\dot{U}.</u> <u>C.R.M.\bullet</u>	
Drosophile adulte	extrait cellulaire	1-42 j.		0	(1)	Massie et al. 1981
Rat	cœur	3-23 m.		0	(2)	Nohl et Hegner, 1978
Homme	fibroblastes WI-38		0	0	(2)	Somville et Remacle, 1980
(syndrome de Werner)	Lymphocytes	38 a.		0	(2)	Marklund et al., 1981

Tableau 2. Modifications enzymatiques liées à la superoxyde dismutase mitochondriale en fonction du vieillissement d'espèces différentes.

* thermolabilité

 Δ activité spécifique

- matériel à réaction croisée

O unités : (1) par mg poids frais; (2) par mg protéines.

j. jour

m. mois

a. année

0 pas de différence avec le vieillissement

L'évolution de l'activité spécifique ne peut pas être significativement corrélée avec la thermolabilité et/ou le matériel à réaction croisée.

On notera également que l'étude de Marklund et al. (1981) sur les lymphocytes et globules rouges de patients atteints du syndrome de Werner (vieillesse précoce et espérance de vie de 45 ans) ne montre pas de modification de l'activité spécifique des super-oxyde dismutases cytoplasmiques ou mitochondriales.

Commentaires tableau 3 .

Malgré le peu de données enzymatiques disponibles dans la littérature, nous constatons que les enzymes lysosomiaux ou mitochondriaux ne présentent pas de thermolabilité accrue au cours du vieillissement de la culture cellulaire. Par contre, les enzymes cytoplasmiques semblent présenter ce phénomène de labilisation.

On remarquera aussi qu'une thermolabilité normale n'est pas accompagnée de C.R.M. (Shakespeare et Buchanan 1978).

Enfin, on notera que la thermolabilisation accrue d'enzymes cytoplasmiques pour des cellules normales (maximum de générations : 53-54), se retrouve pour des enzymes cytoplasmiques dont les cellules sont atteintes du syndrome de Werner (Maximum de générations : 9-10).

Remarques et conclusions

Les résultats présentés ci-dessus, associés aux synthèses bibliographiques - sur les modifications enzymatiques liées au vieillissement cellulaire - réalisées par Houben (1981), Kanungo (1980), Wilson (1981), Waite (1981) et Rothstein (1981), suggèrent les remarques et les conclusions suivantes :

1. Pour une même enzyme, différents auteurs utilisent des unités d'activités dont les paramètres de références sont : mg protéines, volume sanguin, mg DNA, mg d'Hémoglobine etc. à

Culture des cellules

Enzymes	Matériel	Modifications				Références
		Th.*	A.S.Δ	U.°	C.R.M.●	
Cytoplasme glucose-phosphate- isomérase	homme hépatocytes		0	(2)	0	Kahn et al. 1977 b
6 - phosphogluconate déshydrogénase	fibroblastes MRC5- poumon fœtal	0	0	(2)	0	Shakespeare et Buchanan 1978
3 - phosphoglycérate kinase	fibroblastes MRC5- poumon fœtal	+				Holliday et Tarrant 1972
glucose-6-phosphate déshydrogénase	hépatocytes		0	(2)	0	Kahn et al. 1977 b
	fibroblastes MRC5- poumon fœtal	+				Holliday et Tarrant 1972
	fibroblastes WI-38 poumon fœtal	+				Houben et Remacle 1978
	fibroblastes peau- nouveau né	+				Duncan et al. 1977
	fibroblastes peau- nouveau né	0				Pendergrass et al. 1976
pyruvate-kinase	hépatocytes					Kahn et al. 1977 a
lactate-déshydro- génase	hépatocytes		0	(2)	0	Kahn et al. 1977 b
DNA-polymérase	fibroblastes MRC5- poumon fœtal		-	(2)	+	Lewis et Tarrant 1972
	" " "		-	(2)		Murray 1981
	homme - syndrome de Werner					
glucose-6-phosphate déshydrogénase	fibroblastes WS-HMG peau	+				Houben et al. 1980
6 - phosphogluconate déshydrogénase	fibroblastes peau	+				Goldstein et Moerman 1975
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-trans- férase	fibroblastes peau	+				Goldstein et Moerman 1975

Lysosomes	homme						
N-acétyl-β-D-glucosaminidase	fibroblastes WI-38-poumon fœtal	0					Houben et Remacle 1978
N-acétyl-α-D-galactosaminidase	"	0					"
α-D-glucosidase	"	0					"
β-D-galactosidase	hépatocytes		(2)	0			Leray et al. 1981
	homme - syndrome de Werner						
N-acétyl-β-D-glucosaminidase	fibroblastes WI-38-poumon fœtal	0					Houben et al. 1980
N-acétyl-α-D-galactosaminidase	"	0					"
α-D-glucosidase	"	0					"
Mitochondries	homme						
sulphite cytochrome C reductase	fibroblastes WI-38-poumon fœtal	0					Houben et Remacle 1978
	homme-syndrome de Werner						
"	fibroblastes WS-HMG peau	0					Houben et al. 1980

Tableau 3 : Modifications enzymatiques observées sur des enzymes de cellules en culture.

- * thermolabilité
- Δ activité spécifique
- matériel à réaction croisée
- unités : (2) par mg protéines + augmentation.
- 0 pas de différence
- diminution de l'activité avec le vieillissement

l'exception du DNA, ces paramètres évoluent au cours de l'âge et donc les comparaisons sont difficiles à réaliser. A ce sujet, Glass et Gershon (1981) ont montré clairement que la différence d'activité SOD totale par g d'Hémoglobine chez des rats jeunes et vieux était de $\pm 17\%$. Exprimée en unité d'activité SOD par globule rouge, cette différence était de 37,5 % entre les 2 âges considérés.

Il semblerait que ce soit pour ces raisons que Joentje et al., Stevens et al., et Marklund et al., n'aient pas détecté des différences d'activité SOD humaine en fonction de l'âge. Cette activité étant exprimée par g d'Hémoglobine (Joentje et al. 1978), par mg protéine ou par volume sanguin total (Stevens et al. 1975), et par mg protéine (Marklund et al. 1981).

Enfin, exprimées en unités par mg de protéines ou par mg de DNA, les activités enzymatiques ne peuvent rendre compte d'une perte du contenu enzymatique ou d'une perte d'efficacité catalytique (Rothstein 1975).

2. Les âges considérés pour classer un animal vieux varient fortement a) pour une même espèce : Exemples : Rats 12 mois, Rats 24 mois (Bulos et al. 1971), Rats 30 mois (Wilson 1972); b) pour l'étude d'une même enzyme : Exemple : superoxyde dismutase (cfr tableau 1 et 2).

3. Les études de thermolabilité (pour rares qu'elles soient), sont comparables entre elles. Elles présentent une décroissance exponentielle de dénaturation. Cependant, nous mettons en cause la qualité des courbes présentées par Reiss et Gershon qui par manque de points expérimentaux, nous semblent proposer des conclusions pour le moins prématurées (Reiss et Gershon, 1976 b).

4. Les études sur le matériel à réaction croisée (CRM) sont comparables entre elles.

5. Le foie de mammifères a largement été employé dans les études de sénescence. Approximativement 0,01 % des cellules hépatiques sont engagées à tout moment dans un processus de division

(Kanungo 1980). Par conséquent, le foie présente une mixture hétérogène de cellules en divisions et non divisions; et donc, il est clair que les données sur le foie ne peuvent être comparées avec d'autres sur le cerveau ou les muscles squelettiques pour lesquelles leurs cellules sont post-mitotiques(à l'exception des cellules gliales).

Conclusions

1. A la lumière des quelques remarques présentées ici, nous constatons le besoin réel d'approcher à des modèles standard globaux qui permettraient de comparer valablement différents états enzymatiques et donner une image cohérente de l'évolution fonctionnelle des voies métaboliques pour tout organisme en fonction de l'âge chronologique.

Par exemple, des études sur les activités de la glucokinase, la phosphofructokinase, la pyruvate kinase, la pyruvate carboxylase, la fructose 1,6 - diphosphatase et la glucose - 6- phosphatase qui sont les enzymes régulatrices clés respectivement de la glycolyse et de la glyconéogenèse, seraient d'un très grand intérêt dans la compréhension des effets du vieillissement sur le métabolisme du glucose.

2. Si plusieurs auteurs (Rothstein 1975; Baird 1975; Gershon et Gershon 1976; Dreyfus et al. 1977 et 1978; Gershon 1979, Rothstein 1979) tentent d'expliquer l'altération des protéines par l'hypothèse des modifications post-traductionnelles, celle-ci ne peut être considérée comme une explication universelle du vieillissement. Ni les causes, ni les effets d'une telle hypothèse ne prouvent aujourd'hui son impact dans le processus de vieillissement et de mort cellulaire (Dreyfus et al. 1977). Cependant, les modifications post-traductionnelles existent et des mécanismes sont proposés pour expliquer celles-ci. Quels sont-ils ?

1.3.2 Altérations chimiques et protéines modifiées

La glycosylation (Karn et al. 1973), la déamidation (Robinson 1974), l'oxydation de groupement SH (Graff et al. 1978), le clivage de peptides terminaux (Reznick et al. 1979; Gershon 1979), sont autant d'altérations chimiques avancées pour expliquer la perte d'activité et l'accumulation de matériel à réaction croisée pour les protéines d'organes vieux.

La déamidation de groupements asparaginyl et glutaminyl pourrait avoir une influence sur la demi-vie des protéines en favorisant l'attaque hydrolytique des molécules qui possèdent ces groupements. "L'horloge moléculaire" de chaque protéine serait ainsi constituée d'une quantité déterminée de résidus glutaminyl et asparaginyl (Robinson 1979).

Les autres modifications à l'exception de l'oxydation de groupements SH devraient modifier les charges nettes des protéines; cependant, le recours à la technique de focalisation isoélectrique ne peut mettre en évidence de différence de charges pour l'énolase de nématode (Sharma et al. 1976 a), l'aldolase de nématode et la SOD cytoplasmique de foie de rat (Goren et al. 1977), la triose-phosphate-isomérase de nématode (Gupta et Rothstein 1976). De même, l'hypothèse de clivages peptidiques ne trouve pas encore aujourd'hui d'arguments dans une modification de poids moléculaires.

L'oxydation des groupements SH et résidus méthionines constitue un mécanisme possible d'inactivation enzymatique. (Gershon 1979). La production intensive non contrôlée de radicaux libres dans les cellules vieilles serait à l'origine d'accumulation de protéines semi-ou complètement inactives (Harman 1956, 1962, 1969, 1978; Halliwell 1978). Une étude préliminaire non publiée de Reiss et Gershon laisserait supposer une oxydation des groupements SH et

résidus méthionines de la SOD de foie de rat âgé (cité dans Gershon 1979). Cependant, Sharma et Rothstein (1980) n'ont pu mettre en évidence ce type de modification sur l'énolase de nématode. Par contre, Truscott et Augusteyn (1977) montrent que dans le cas de cataractes avancées, 90 % de la cytéine et 45 % de la méthionine sont oxydées. De plus, le plus haut degré d'oxydation se retrouve dans la couche cellulaire la plus âgée du cristallin et décroît proportionnellement au fur et à mesure que l'on rencontre des couches cellulaires jeunes.

Nous constatons donc que les causes des modifications enzymatiques "âge-dépendantes" sont dans le cas qui nous occupe, peu généralisables. Le poids moléculaire, la mobilité électrophorétique, l'antigénicité, le Km, la séquence d'acides aminés et le Ki restent apparemment inchangés (Reiss et Gershon 1976 b). Par contre, l'activité spécifique par unité d'antigène réduite et l'augmentation de la thermolabilité semblent indiquer qu'il faille s'orienter vers l'examen de changements conformationnels possibles intervenant au niveau des molécules (Gershon 1979; Rothstein 1979 et 1981).

1.3.3 Changements conformationnels et protéines modifiées

L'hypothèse de modifications enzymatiques post-traductionnelles dues à des changements de conformation de l'enzyme sans apparition de réaction covalente ni de changements dans la séquence des acides aminés a été émise par les laboratoires de Rothstein et Gershon (Rothstein 1975; Rothstein 1977; Rothstein 1979; Gershon 1979; Rothstein 1981; Dreyfus et al. 1978).

L'énolase purifiée de l'espèce *Turbatrix aceti* vieille montre, par rapport à l'énolase jeune, des différences de conformation visualisée par une augmentation de l'absorbance spécifique à 280 nm.

Ni l'oxydation de groupements SH, ni un mécanisme protéolytique ne semblent impliqués dans ce changement conformationnel (Rothstein 1979). De plus, l'énolase jeune chromatographiée sur colonne échangeuse d'ions acquiert un comportement enzymatique comparable à celui de l'enzyme vieille (thermolabilité biphasique). Ceci exclut donc une modification dans la séquence des acides aminés ou l'apparition de liens covalents (Rothstein 1977; Sharma et Rothstein 1978 et 1980). La même expérience sur l'énolase vieille conduit aux mêmes conclusions (Sharma et Rothstein 1976 b).

De même, le comportement de la β -galactosidase vieille d'*Escherichia coli* ne peut s'expliquer par une variabilité dans la séquence des acides aminés ou l'impact de facteurs extrinsèques (Rotman 1970), mais plutôt par un changement de conformation dans la chaîne de la protéine native.

L'augmentation de la thermolabilité de la phosphorylase du cœur de souris serait due au passage des molécules dimériques (prédominante chez les organismes jeunes) vers la forme tétramérique (Capasso et Zimmerman 1980). Ce même raisonnement a été appliqué par Duncan et al. qui expliquent l'apparition d'une thermolabilité biphasique de la glucose - 6 - phosphate désydo-génase de cellules WI-38 vieilles par une transformation des dimères en tétramères (Duncan et al. 1977).

Dans les tissus qui n'ont pas de synthèse protéique - comme les globules rouges ou les couches centrales du cristallin -, les altérations protéiques ne peuvent être que post-traductionnelles. Ce problème n'est certainement pas résolu a) dans les tissus qui maintiennent une synthèse active et un taux de renouvellement protéique permanent. b) si l'on admet que les enzymes altérées sont plus sensibles à la dénaturation, à la protéolyse (Goldberg 1972).

Ainsi, la question fondamentale revient à se demander pourquoi et comment des molécules altérées peuvent s'accumuler alors que de nouvelles sont synthétisées ?

La plus attractive des approches que l'on puisse imaginer revient à essayer de corrélér les molécules altérées avec leur taux de renouvellement.

Zeelon et al. (1973) ont montré que l'aldolase de *Turbatrix aceti* avait un temps de demi-vie ($T_{1/2}$) de 35 heures (jeunes animaux) et 250 heures chez les animaux âgés. Pour les mammifères, l'évolution du temps de demi-vie pour une même protéine est largement controversée (Goldberg et Dice 1974).

Cependant, une étude réalisée par Shapira et al. (1978) sur la lactate déshydrogénase ($T_{1/2} \pm 4$ jours), l'aldolase B ($T_{1/2} \pm 35$ heures) et la Tyrosine-Amino-transférase ($T_{1/2} \pm 1,5$ heures) de foie de rats vieux montre :

a) que seule la LDH ($T_{1/2}$ long) présente un matériel à réaction croisée dont la disparition peut être induite après hépatectomie partielle et montre donc que le C.R.M. est un phénomène post-traductionnel.

b) que la thermolabilité de la Tyrosine-Amino-Transférase ($T_{1/2}$ court) est identique pour des rats jeunes (5 mois) et âgés (29 mois) impliquant donc un effet du temps de demi-vie court.

L'hypothèse des modifications post-traductionnelles liées à une augmentation du temps de demi-vie des protéines a été également avancée par Rothstein. Cette hypothèse s'appuie sur le postulat suivant : au cours du vieillissement, le taux de synthèse protéique et le taux de dégradation (ou protéolyse) décroissent au point de rendre compte d'une augmentation du $T_{1/2}$ et d'une accumulation de protéines altérées.

Le modèle proposé par Rothstein (1975, 1977) (figure 1) rend compte d'une dynamique dans laquelle progressivement, une enzyme jeune native subit des altérations et est finalement dénaturée et protéolysée.

L'absence de modification pour les enzymes mitochondriales et lysosomiales s'expliquerait soit par leur grande stabilité et leur compartimentation les protégeant d'attaques post-traductionnelles cytoplasmiques, soit par une impossibilité de détection des intermédiaires altérés liée à un temps de demi-vie très court.

Le ralentissement de la vitesse de renouvellement engendrerait l'accumulation des formes altérées (Zeelon 1973, Reznick et al. 1981) et les résultats contradictoires sur les altérations enzymatiques trouveraient une explication dans les variations du taux de renouvellement pour chaque système cellulaire étudié.

Cependant, cette hypothèse d'une diminution de la vitesse de renouvellement est loin d'être clarifiée aujourd'hui: les résultats à ce sujet sont fortement contradictoires (Wiederanders et al. 1978; Goldstein et al. 1976).

Comme nous l'avons laissé sous-entendre à propos des enzymes lysosomiales et mitochondriales, on ne peut exclure une stabilisation des molécules altérées engendrée par le milieu environnant (variation de pH, potentiel redox, présence ou absence de facteurs cytoplasmiques):

les enzymes cloisonnées dans des compartiments subcellulaires sont protégées du cytoplasme modifié.

Enfin, ce modèle ne rend pas compte d'une réversibilité possible d'une forme enzymatique altérée vers une forme enzymatique normale (ou native).

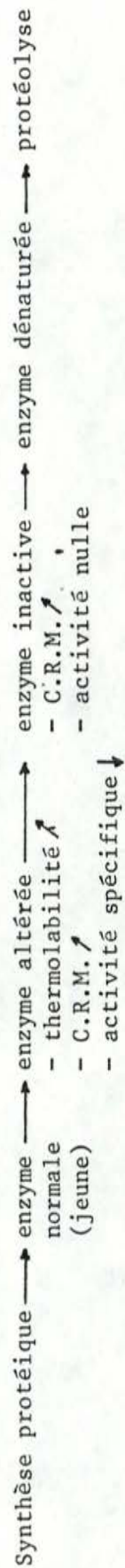


figure 1 : Modèle d'altération des enzymes au cours du vieillissement
selon Rothstein (1975, 1977) C.R.M. = matériel à réaction
croisée.

Ainsi, si Kahn et al. (1977 a) ont montré qu'un environnement cellulaire vieux provoquait l'apparition d'une forme plus thermolabile de la glucose - 6 - phosphate deshydrogénase jeune, nous montrerons que la SOD cytoplasmique jeune de fibroblastes WI-38 acquiert un comportement thermolabile vieux dans un environnement cellulaire vieux. Inversément, une forme thermolabile vieille de la SOD cytoplasmique acquiert un comportement jeune dans un environnement cellulaire jeune (Somville et Remacle 1980 et 1981).

Nous abordons dans le chapitre II, la théorie du vieillissement cellulaire basée sur la présence des radicaux libres. Cette théorie examinée sous l'angle du mécanisme de défense de la cellule contre l'oxygène est une approche de notre travail et rencontrera ultimement, l'hypothèse des modifications post-translationnelles (J-C. Dreyfus et al. 1978 et Rothstein 1981).

CHAPITRE II : APPROCHE DU VIEILLISSEMENT PAR LE MECANISME DE
DEFENSE DE LA CELLULE CONTRE L'OXYGENE

2.1 Toxicité de l'oxygène

Dire que l'oxygène (O_2) est toxique pour la plupart des êtres vivants peut sembler paradoxal. Louis Pasteur a sans doute été le premier à réaliser l'importance de ce paradoxe. Ainsi, étudiant au microscope une goutte de culture d'un micro-organisme anaérobie : le vibrium butyrique, il remarqua que les vibriums qui jouxtaient les bords de la lame s'immobilisaient les premiers bientôt suivis par ceux qui en étaient plus éloignés.

Il en conclut que l'oxygène de l'air diffusant peu à peu dans le milieu de suspension tuait les micro-organismes.

Plus tard, Haugaard (1968) montra que l'oxygène était toxique du fait de son action sur les enzymes. Il mit en évidence l'inactivation irréversible d'une nitrogénase de *Clostridium pasteurianum* (bactérie anaérobie) après exposition brève de cette bactérie dans un milieu oxygéné.

Si nous supportons apparemment sans inconvénient des concentrations en O_2 dans l'air de l'ordre de 20 %, il nous faut reconnaître que nous restons vulnérables à des concentrations supérieures. L'homme placé dans un environnement d'un atmosphère en oxygène pendant 6 heures souffrira dans les heures qui suivent d'une inflammation trachéale et après quelques jours, de lésions pulmonaires pouvant entraîner la mort (Bishop 1978).

La cécité complète par fibrose rétro-cristallinienne qui touchait des centaines d'enfants prématurés soumis à un séjour prolongé en incubateur à oxygène (35 - 40 % O_2 pendant 19 jours) en est un autre exemple (Fridovich 1978 a et 1978 b).

Examinons les raisons pour lesquelles l'oxygène, bien que molécule indispensable à notre vie, est également une molécule toxique.

2.2 Oxygène et radical superoxyde

L'oxygène moléculaire à son état fondamental est paramagnétique car il possède deux électrons non appariés de spins parallèles; c'est un diradical ($\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$). Cette situation entraîne une impossibilité de réduction divalente directe puisque les deux électrons ajoutés devraient avoir également des spins parallèles. Cette restriction de spin explique la réactivité peu importante de cette molécule en tant qu'oxydant.

Cependant, comme proposé par Taube (1965) et Hamilton (1974), trois voies de réduction de l'oxygène moléculaire existent qui contournent cette restriction de spin.

La première consiste à exciter l' O_2 en inversant le spin d'un des électrons non appariés et former ainsi l'oxygène singulet plus réactionnel que l'état fondamental. Deux états singulets sont accessibles à l'expérimentation l'un à 23 Kcal ($^1\Delta_g$), l'autre à 37 Kcal ($^1\Sigma_g^+$). Il est à remarquer que ces niveaux d'énergie peuvent être atteints par l'apport d'énergie lumineuse (Krasnovsky et Kagan 1979) (Figure 2)

ENERGIE	↑	ORBITALES	ETAT FONDAMENTAL TRIPLÉT	ETAT EXCITE SINGULET $^1\Delta_g$ (23 Kcal)	ETAT EXCITE SINGULET $^1\Sigma_g^+$ (37 Kcal)
		$\pi_{2py,2pz}$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$
		$\pi_{2py,2pz}$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$
		σ_{2px}	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$

Figure 2 : schéma des orbitales moléculaires de l'oxygène à l'état fondamental (triplet) et excité (singulet)

Une seconde voie consiste à lier l'oxygène à un métal de transition possédant lui-même des électrons de spins non appariés. Le complexe formé peut accepter une paire d'électrons dont la délocalisation dans le complexe, suivra un appariement correct de spins. Il s'agit là, d'une voie suivie dans le processus catalytique des métalo-oxydases comme la cytochrome oxydase.

Une troisième voie implique l'addition des électrons un à un à l'oxygène moléculaire. Dans cette voie univalente de la réduction de l'oxygène, une inversion de spin peut facilement se réaliser pendant la durée de vie des intermédiaires qui apparaissent après chaque réduction successive par un seul électron. C'est le processus habituel de réductions spontanées de l'oxygène.

Comme décrit à la figure 3, la réduction complète de l'oxygène moléculaire provoque la formation du radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet(-)}$), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et du radical hydroxyle (OH^\bullet) comme intermédiaires successifs menant à la formation de molécules d'eau (Figure 3).

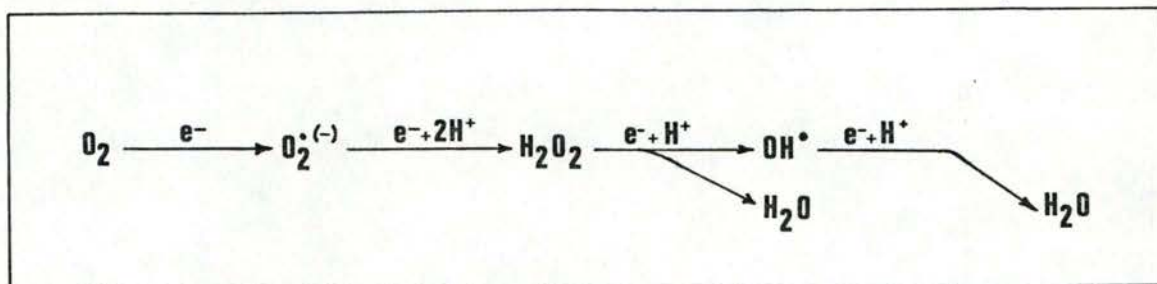


Figure 3 : voie de réduction univalente de l'oxygène moléculaire.

Ces observations laissent supposer que ces intermédiaires très réactionnels ne sont pas tolérés par le tissu vivant. Leur capture et contrôle a été, dès l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère primitive, un facteur déterminant dans la pression de sélection évolutive des premiers aérobies.

Dès lors, plusieurs mécanismes ont été mis en place pour contrer ces intermédiaires. Nous y reviendrons par la suite.

2.3. Propriétés générales et sources biologiques des radicaux superoxydes

Le radical superoxyde ($O_2^{\bullet(-)}$) est la base conjuguée du radical hydroperoxyl (HO_2^{\bullet}), acide faible de pKa compris entre 4,5 et 4,9 (Behar et al. 1979). L'anion superoxyde est instable en milieu aqueux et se dismute spontanément en générant des peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) et de l'oxygène (O_2). Ce taux de dismutation spontanée est fonction du pH qui, plus proche du pKa entraînera une dismutation plus importante.

Au pH inférieur à 4,8, la forme HO_2^{\bullet} sera dominante alors qu'au pH supérieur, c'est la forme $O_2^{\bullet(-)}$ qui dominera. D'une manière générale, on accepte pour les réactions proposées, les constantes suivantes :

pH	Réactions	K ($M^{-1} \text{ sec}^{-1}$)	Références
< 4,8	$HO_2^{\bullet} + HO_2^{\bullet} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$	$7,6 \cdot 10^5$	Bielsky et Allen 1977, Czapski 1971
4,8	$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet(-)} + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$	$8,8 \cdot 10^7$	" "
7,4	$O_2^{\bullet(-)} + O_2^{\bullet(-)} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$	$2,0 \cdot 10^5$	Behar et al. 1970
≥ 12	$O_2^{\bullet(-)} + O_2^{\bullet(-)} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$	< 100	Fee et Valentine 1977

A pH 7,4, la dismutation spontanée : $O_2^{\cdot(-)} + O_2^{\cdot(-)} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (1) possède une constante de vitesse de $2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Behar et al. 1970)

Au pH supérieur à 12, la réaction (1) est extrêmement lente. Il faut voir là le jeu de forces de répulsion électrostatiques mutuelles (Fee et Valentine 1977).

Comme nous le verrons bientôt, cette réaction (1) est fondamentale car elle peut être catalysée par la superoxyde dismutase (SOD).

Sources de radicaux superoxydes

Malgré le fait que toutes les sources biologiques de production de radicaux superoxydes ne sont pas encore connues (Britton 1978), nous présentons dans le tableau 4 l'état des connaissances actuelles dans ce domaine.

Il y a de bonnes raisons de conclure que les cellules aérobies génèrent des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot(-)}$). Cependant, ce sont des arguments indirects qui ont confirmé cette hypothèse et ont permis de dégager les niveaux de cytotoxicité de ces radicaux à partir de la découverte par Mc Cord et Fridovich (1969 a) de l'existence d'une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD), capable de détruire ces radicaux et de protéger ainsi la cellule d'un des dérivés de l'oxygène.

<u>Sources</u>	<u>Agents</u>	<u>Références</u>
<u>Autoxydations</u>	Hydroquinones Leucoflavines Catécholamines Thiols Colorants réduits Ferredoxines Hémoprotéines Hématoporphyrines NADPH cytochrome P-450 réductase Xanthine oxydase Aldéhyde oxydase Dihydro-orotic déshydrogénases Flavoprotéines déshydrogénases NADH déshydrogénase mitochondriale de bœuf.	Mc Cord 1970. Misra 1974. Mc Cord 1970; Nishikimi 1972 Balny 1974. Orme - Johnson 1969; Misra 1971. Misra 1972; Wallace 1974. Buettner 1980. Bösterling 1981. Mc Cord 1968, 1969 a; Fridovich 1970. Rajagopalan 1962, 1964. Aleman 1967. Massey 1969. Turens 1980.
<u>Catalytiques</u>		
<u>Catalytiques</u> (inhibées par la superoxyde dismutase)	Tryptophane dioxygénase intestinale Hydroxylase microsomale de foie Hydroxylases solubles d' <i>Aspergillus niger</i> Galactose oxydase de <i>Dactylium dendroïdes</i>	Hirata 1971. Strobel 1971. Kumar 1972. Hamilton 1973.
<u>Productions par les organites</u>	Leukocytes pendant la phagocytose Chloroplastes illuminés Microsomes de foie Mitochondries (+ production de OH [•]) Noyaux hépatiques d'hamster Hépatomes de Morris	Babior 1973, Salin 1975. Epel 1973, Asada 1974. Aust 1972. Cadenas 1977, Nohl 1978, Nohl et al. 1981. Patton 1980. Bize 1980.

Tableau 4 : Sources possibles de radicaux superoxydes ($O_2^{•(-)}$)

2.4 Cytotoxicité des radicaux superoxydes

Sur l'importance des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot(-)}$) dans la cytotoxicité cellulaire, existait jusqu'il y a peu, une controverse.

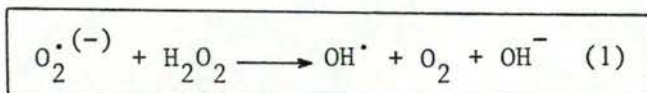
La littérature est riche en exemples montrant que l'induction de flux d' $O_2^{\cdot(-)}$ par des réactions enzymatiques, photochimiques ou électrochimiques soit :

- décompose le méthional en éthylène (Beauchamp et Fridovich 1970),
- inactive des virus (Lavelle et al. 1973),
- tue des bactéries (Gregory et Fridovich 1974 a, Babior et al. 1975),
- lyse des erythrocytes (Kellogg et Fridovich 1977),
- détruit les myoblastes en culture (Michelson et Buckingham 1974),
- initie la peroxydation de linoléate (Kellogg et Fridovich 1975),
- dépolymérise l'hyaluronate (Mc Cord 1974),
- inactive des enzymes (Lavelle et al. 1973, Kellogg et Fridovich 1977),
- et endommage le DNA (Van Hemmen et Meuling 1975).

Cependant, dans tous les cas, l'effet dommageable du radical $O_2^{\cdot(-)}$ dépendait de la présence simultanée d' H_2O_2 . Par exemple : Beauchamp et Fridovich montraient en 1970, que du méthional ($CH_3 - S - CH_2 - CH_2 - CHO$) exposé à l'action de la xanthine oxydase, donnait de l'éthylène. La réaction catalysée par la xanthine oxydase était connue pour produire de l' H_2O_2 et des radicaux $O_2^{\cdot(-)}$. De plus, la superoxyde dismutase et la catalase inhibe^{nt} la production d'éthylène l'une par la capture des $O_2^{\cdot(-)}$, l'autre par la destruction de l' H_2O_2 .

Ces auteurs concluaient donc que l' $O_2^{\bullet(-)}$ et l' H_2O_2 étaient nécessaires à cette réaction (Beauchamp et Fridovich 1970).

Dès 1934, Haber et Weiss proposaient un modèle de décomposition de l' H_2O_2 en présence de fer par la réaction (1).



Cela supposait donc que la coexistence d' $O_2^{\bullet(-)}$ et d' H_2O_2 induit la production de radicaux hydroxyl (OH^{\bullet}) qui attaquaient le méthional pour le transformer en éthylène (Haber et Weiss 1934).

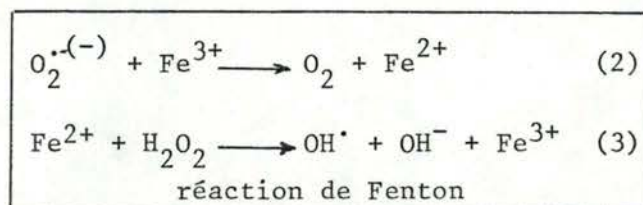
Une importante démonstration de l'action toxique du radical $O_2^{\bullet(-)}$ a été réalisée par Fee et Teitelbaum (1972) sur des érythrocytes de rats déficients en vitamine E. Ces auteurs mirent en évidence le rôle hémolytique de l'acide dialurique dont l'apparition était partiellement supprimée soit par la catalase, soit par la superoxyde dismutase, mais qui étaient complètement abolis par la présence simultanée des deux enzymes. Ces résultats suggéraient donc une nouvelle fois la coopération de l' H_2O_2 et de l' $O_2^{\bullet(-)}$ pour produire par la réaction d'Haber-Weiss (réaction 1) un intermédiaire OH^{\bullet} très toxique.

Dans notre premier exemple, la présence au cours de l'expérience d'éthanol ou de benzoate (capteurs de radicaux OH^{\bullet}), inhibait complètement la production d'éthylène. De plus, Bors et al. (1976) montraient que le méthional réagissait rapidement non pas avec le radical $O_2^{\bullet(-)}$ mais bien avec le radical OH^{\bullet} .

Dans un autre exemple, des liposomes artificiels soumis à l'influence d'un flux d' $O_2^{\bullet(-)}$ et d' H_2O_2 , présentent une peroxydation intense (Kellogg et Fridovich 1977). Celle-ci est prévenue

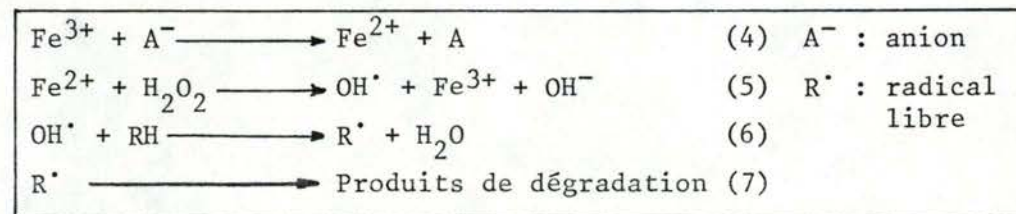
par la superoxyde dismutase, la catalase, ou le mannitol, suggérant une nouvelle fois la coopération entre $O_2^{\cdot(-)}$ et H_2O_2 pour produire un radical OH^{\cdot} .

La controverse en matière de cytotoxicité du radical $O_2^{\cdot(-)}$ est née de ce que certains auteurs ont estimé que la réaction d'Haber-Weiss était impossible (Mc Clune et Fee 1976). En effet, expérimentalement, il était impossible de démontrer une réaction directe entre $1'O_2^{\cdot(-)}$ et $1'H_2O_2$ (Halliwell 1976). La contradiction apparente devant laquelle on se trouvait semble trouver une explication par la présence dans certaines expériences de traces de composés ferriques qui catalysent la réaction d'Haber-Weiss et modifient ainsi les conclusions des expériences. Ainsi, $1'O_2^{\cdot(-)}$ peut réduire le composé ferrique (réaction 2) en ferreux qui, lui-même, réduit $1'H_2O_2$ (réaction 3) pour donner $1'OH^-$ et le radical OH^{\cdot} (réaction de Fenton).



Bielski a montré que les sels de Fer étaient des catalyseurs puissants de la réaction d'Haber-Weiss et ce, même en présence d'un excès d'EDTA ! (Bielski et Allen 1977).

Afin d'expliquer les résultats biologiques précédents, Fee (1980) a proposé récemment, une série généralisée de réactions qui sont :



Cette suite d'équations semble répondre aujourd'hui le mieux, aux observations biologiques effectuées dans ce domaine.

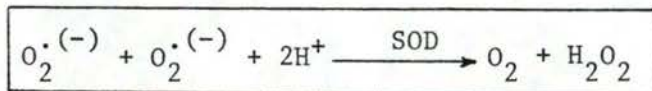
Ainsi, nous sommes certains aujourd'hui que la production d' $O_2^{\cdot(-)}$ produit un radical plus toxique que les premiers et donc que la "cytotoxicité de $O_2^{\cdot(-)}$ " réside avant tout, dans sa potentialité à réagir avec H_2O_2 ou les peroxydes organiques (Fee 1980). La cellule a donc dû mettre au point un système strict de contrôle de ces composés pour garantir sa viabilité. Nous verrons que ces mécanismes ont effectivement pour rôle :

- 1) d'empêcher la réalisation de la réaction d'Haber-Weiss
- 2) de minimiser les dommages causés par les radicaux OH^{\cdot} .

2.5 Les superoxyde dismutases (SOD)

C'est en 1939 que Mann et Keilin isolèrent des érythrocytes de bœuf, une protéine bleutée de poids moléculaire égal à 34.000 et contenant 0,34 % de cuivre : "l'hémocuprein" (Mann et Keilin, 1939). En 1959, Markowitz et al. isolèrent une protéine semblable à partir de globules rouges humains : "l'erythrocuprein" (Markowitz et al. 1959). Pour ces deux protéines, aucune activité catalytique ne fut trouvée.

D'autres découvertes du même type furent réalisées, certaines pour mettre en évidence une "cerebrocuprein" (Porter et Folch 1957), d'autres encore pour isoler une "hepatocuprein" à partir du foie de bœuf (Mann et Keilin 1939) ou de cheval (Mohamed et Greenberg 1953). Toutes ces protéines restaient orphelines d'une quelconque activité enzymatique. Il fallut attendre les travaux de Mc Cord et Fridovich (1968, 1969 a et 1969 b) pour proposer et démontrer que ces enzymes identiques par leur poids moléculaire et la présence de cuivre, possédaient comme pouvoir catalytique, la dismutation des radicaux superoxydes par la réaction :



Il fallut quelques dix années de recherches (Mc Cord et Fridovich 1977) pour que ces auteurs démontrent que des enzymes comme la xanthine oxydase, étaient capables de produire des radicaux superoxydes et que cette production était inhibée par une enzyme qu'ils appelèrent superoxyde dismutase.

Dans le même temps, ces auteurs montraient que tout système vivant en aérobie avait développé un système de défense contre l'oxygène, par le biais de la dismutation des radicaux $O_2^{\cdot(-)}$.

Comme nous l'avons vu précédemment, la dismutation spontanée des radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ se réalise à pH 7,4 avec une constante de vitesse de $2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Était-il nécessaire dès lors que le vivant ait produit une enzyme qui catalyse en plus cette réaction ?

Différents arguments peuvent être proposés :

1) à pH 7,4 dans un environnement aqueux, $O_2^{\cdot(-)}$ se dismute spontanément avec une constante de vitesse de $2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Cette constante peut paraître grande, mais, en fait, il s'agit d'une réaction d'ordre 2 en $O_2^{\cdot(-)}$. La concentration d' $O_2^{\cdot(-)}$ dans les tissus est estimée à 0,1 nM. A cette concentration et malgré une constante de vitesse élevée, la dismutation spontanée sera très lente. Par contre, la réaction entre $O_2^{\cdot(-)}$ et la SOD est une réaction d'ordre 1 en substrats; la concentration moyenne de la SOD dans le foie humain est estimée à $3 \cdot 10^5 \text{ M}$. Sur base de la concentration tissulaire en $O_2^{\cdot(-)}$, on voit que la dismutation catalysée serait 10^5 fois plus rapide que la dismutation spontanée si la constante de la réaction enzymatique était identique à celle de la réaction spontanée. En fait, au pH physiologique, la constante de dismutation enzymatique ($2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) est 10^4 fois plus grande que la réaction spontanée ($2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$). Ainsi, dans la cellule, l'avantage de la dismutation des $O_2^{\cdot(-)}$ par la SOD intracellulaire par rapport à la réaction spontanée est de l'ordre de 10^9 (Klug et al. 1972, Pick et al. 1974, Fridovich 1975 et 1978 b).

2) La recherche sur la chimie et la biochimie des $O_2^{\cdot(-)}$ étant encore à un stade relativement jeune, ce sont des arguments indirects qui vont nous montrer l'importance de la SOD.

- a) Seules les cellules aérobies peuvent produire des $O_2^{\cdot(-)}$ et donc doivent posséder une défense contre ces radicaux. Les micro-organismes aérobies ou aérotolérants possèdent de la SOD, alors que la plupart des anaérobies obligés en sont dépourvus (Mc Cord et al. 1971, Hewit et Morris 1974). De plus, les espèces aérotolérantes qui perdent cette enzyme sont incapables d'utiliser l' O_2 (Gregory et al. 1974 a).
- b) Chez *Streptococcus faecalis* et *Escherichia coli* (Gregory et Fridovich 1973 a et 1973 b) et *Saccharomyces cerevisiae* (Gregory et al. 1974 a), on peut induire la superoxyde dismutase par augmentation de la tension en O_2 dans l'environnement de croissance de ces micro-organismes. Cette adaptation physiologique démontre donc l'importance de la SOD dans la prévention des dommages susceptibles d'être causés par un environnement hyperoxyde. De toutes les observations obtenues sur micro-organismes, il se vérifie que la SOD est essentielle à la vie des cellules en présence d'oxygène moléculaire et donc comme moyen de défense contre les anions $O_2^{\cdot(-)}$.
- c) Au cours de leur culture "in vitro", des myoblastes de fœtus de veaux seront endommagés s'ils sont exposés à des flux photochimiques d' $O_2^{\cdot(-)}$. L'enrichissement du milieu de culture en SOD protège ces cellules d'une létalité précoce induite par l' $O_2^{\cdot(-)}$ (Michelson et Buckingham 1974).

2.5.1 Evolutions et distributions des superoxyde dismutases (SOD)

Toutes les SOD sont des métallo-protéines qui se répartissent en 2 classes phylogénétiques en fonction du degré d'homologie de leur séquence en acides aminés et en 3 types distincts en fonction du métal présent dans leur site actif (Tableau 5).

Les SOD à Manganèse et Fer sont caractéristiques des procaryotes et montrent un grand degré d'homologie de séquence (Steinman et Hill 1973; Harris et Steinman 1977).

Les SOD à cuivre - zinc de vertébrés, champignons et plantes possèdent une grande similitude de composition en acides aminés et un très grand degré d'homologie structurale. Elles ne présentent aucune homologie de séquence avec les SOD-Fe et les SOD-Mn (Harris et Steinman 1977).

Ainsi, en déterminant la séquence complète de la SOD-Mn d'*Escherichia coli*, Steinman (1978) montrait qu'il n'existait aucun degré d'homologie entre la SOD-Mn et la SOD-Cu Zn. Ces deux classes d'enzymes possèdent donc une origine évolutive différente qui aurait cependant pu répondre à la même pression de sélection lors de la transformation oxydante de l'atmosphère primitive.

Il est d'ailleurs intéressant de souligner que la théorie des symbiontes, proposée en partie pour expliquer l'émergence des eucaryotes il y a environ un milliard d'années, peut utiliser comme argument le haut degré d'homologie de séquence entre les SOD mitochondriales et bactériennes. Cette hypothèse veut en effet que les mitochondries soient le résultat d'une symbiose endocellulaire réalisée à partir des procaryotes (Fridovich 1974 a).

Superoxyde dismutases				
Classe phylogénétique	Procarvates		Eucaryotes	
	anaérobies	aérotolérants et aérobies		
Type	(SOD - Fe) (1) ↑ Transfert de gènes?	SOD - Fe (1) SOD - Mn (2) Théorie des symbiontes?	SOD - Mn (2)*	SOD - Cu Zn (3)**
Distribution	Protoplasme	Protoplasme	Matrice mitochondriale	cytoplasme espace inter- membranaire

Tableau 5 : Représentation par classes phylogénétiques, types et distributions des SOD présentes dans le vivant.

(1) SOD à Fer

(2) SOD à Manganèse

(3) SOD à Cuivre et Zinc

* codée au niveau chromosome 6 (Homme) (Creagan et al. 1973, Sinet 1977)

** codée au niveau du chromosome 21 (Homme) (Tan et al. 1973)

A propos de la distribution sub-cellulaire des SOD, Peeters-Joris et al. (1975) ont montré dans le cas du foie de rat, que 87% de l'activité dismutasique totale se retrouve dans la fraction soluble; les 13% restant étant localisés pour moitié dans la matrice mitochondriale et pour moitié dans l'espace inter-membranaire. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Mc Cord (1979 b) et les nôtres obtenus sur fibroblastes WI-38, puisque nous montrons que l'activité de la SOD cytoplasmique Cu Zn est identique à celles des mitochondries.

Enfin, la SOD inter-membranaire, comme la SOD de la fraction soluble n'est pas inhibée par 1 mM en KCN, (propriété propre au SOD - Cu Zn). La SOD - Mn (inhibée par 1 mM KCN) est localisée dans la matrice mitochondriale (Tyler 1975, Peeters-Joris et al. 1975, Panckenko et al. 1975, Westman et Marklund 1981).

L'adaptation en biologie révèle parfois des surprises. Ainsi, Puget et Michelson (1974) ont mis en évidence l'existence d'une SOD-Cu Zn chez un procaryote symbionte : *Photobacterium leiognathi*. Cette exception est intéressante pour le zoologiste car cette bactérie luminescente est un symbionte du poisson "*Poney leiognatus*" qui l'héberge au niveau de sa vessie natatoire ventrale dans une glande spécialement destinée à cet effet.

Ayant pour habitude de nager en surface, ce petit poisson serait une proie aisément repérée du fond de l'eau par ses prédateurs puisqu'il se découperait en ombre chinoise sur la brillance de la surface. Pourvue de la bactérie luminescente, sa face ventrale se marie à la luminosité de la surface de la mer et le camoufle des prédateurs (Puget et Michelson 1974).

Récemment, Martin et Fridovich (1981) ont montré la similitude - tant du point de vue physicochimique que du point de vue

de la composition en acides aminés - qui existe entre les SOD - Cu Zn du poisson et celle de la bactérie. L'hypothèse la plus vraisemblable retenue par ces auteurs est le transfert naturel du gène du poisson poneyfish vers la bactérie. En d'autres termes, nous serions pour la première fois en présence d'un passage de gènes d'une forme eucaryote vers une forme procaryote.

Un deuxième exemple sur la présence de SOD chez les bactéries anaérobies nous montre l'intérêt de l'étude de la SOD pour comprendre les mécanismes de l'évolution.

Ainsi, la présence chez 2 micro-organismes primitivement anaérobies - *Desulfovibrio desulfuricans* (Hatchikian et al. 1977) et la photosynthétique *Chromatium* (Asada et al. 1976) - de SOD - Fe semblable à la SOD - Fe d'*Escherichia coli* (Hassan et Fridovich 1977) a fait naître deux interrogations :

1. La SOD - Fe est-elle la forme primitive des SOD acquise par les premiers anaérobies stricts pour se protéger de la pression sélective de l'oxygène ou bien,
2. La SOD - Fe chez les anaérobies est-elle une acquisition récente, produite par transfert de gènes, pour leur permettre de survivre durant la période de transition à un environnement oxydant ?

Il semble que l'apparition erratique de cette SOD chez les organismes anaérobies (Tally et al. 1977, Hewitt et Morris 1974) prêche en faveur de la seconde hypothèse.

Quelle que soit la réponse à ces questions, l'histoire de l'évolution des SOD pose aux biologistes de fascinantes questions non encore résolues.

2.5.2 Propriétés physicochimiques et mécanisme catalytique

Isolées à partir de tissus d'Eucaryotes très différents (Fridovich 1978 c), les SOD-Cu Zn présentent une très grande identité immunologique (Shields et al. 1961; Hartz et al. 1973). Par la technique d'hybridation de cellules, on a pu montrer que la SOD-Cu Zn était codée à partir du chromosome 21 (Tan et al. 1973), le chromosome 6 codant pour la SOD Mn (Creagan et al. 1973, Sinet 1977).

La SOD-Cu Zn est un dimère dont le poids moléculaire est de 32.000 daltons; chaque sous-unité contient en son site actif un atome de cuivre et de zinc séparés approximativement d'une distance de 6 Å.

La séquence complète en acides aminés et l'analyse par diffraction aux Rayons X de la SOD-Cu Zn de globules rouges bovins ont montré que la sous-unité ressemble à un cylindre composé de 8 brins de chaînes peptidiques arrangées en structure β anti-parallèle. Deux brins non hélicoïdaux impliquant les résidus 48-79 et 119-141 débordent d'un côté du cylindre (β -barrel) et ensemble constituent le site actif. Chaque sous-unité est stabilisée par un pont disulfure intra-chaîne entre la cystéine-55 et la cystéine-144. Les deux sous-unités sont associées de manière non covalente (Dunbar et Johansen 1981; Barra et al. 1980). Cette enzyme est extrêmement stable et reste active même en présence de 9 % en urée ou 4 % en SDS (Forman et Fridovich 1973). Par contre, la dialyse à pH faible (3,8) contre de l'EDTA (10^{-3} M) entraîne la perte à plus de 40 % du cuivre et du zinc avec une perte concomitante d'activité (Weser et al. 1971). Seule l'addition du cuivre à l'apoenzyme restaure l'activité complète. Le zinc peut être remplacé par du Co^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} entraînant des changements d'activité de faible amplitude (Mc Cord 1969 b; Beem et al. 1974; Fee et Briggs 1975; Forman et Fridovich 1973).

Il a été démontré que le cuivre jouait un rôle actif dans la catalyse alors que le zinc semblait jouer un rôle de cohésion structurale dans la molécule. La présence de cyanure inactive réversiblement l'activité SOD-Cu Zn (Simonyan et Nalbandyan 1972; Fee et Dicorleto 1973); la SOD - Mn reste insensible à ce traitement (Weisiger et Fridovich 1973 b). Réciproquement, la méthode de "Tsuchihashi" consiste à inhiber la SOD - Mn par un traitement chloroforme/méthanol (3:5 v/v) tout en gardant intacte l'activité de la SOD - Cu Zn (Fridovich 1974 b).

Le site actif consiste en un atome de cuivre (II) entouré de 4 résidus histidine (His-44,-46,-61 et 118). De plus, l'His-61 semble créer un lien "anion imidazolate" entre le Cu (II) et le Zn (II). Ce dernier atome étant lui-même en co-ordination avec 2 résidus histidine (His-69, -78) et un résidu acide aspartique (Asp-81)(Figure 4).

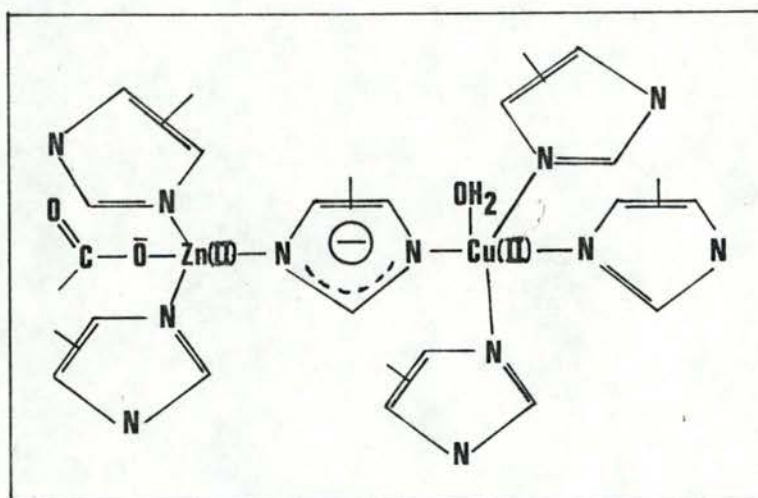


Figure 4 : Schéma du site actif de la SOD - Cu Zn proposé par Fee et al. (1981).

Selon Richardson et Fee (Richardson et al. 1975; Fee et al. 1981), le mécanisme catalytique se déroulerait de la manière suivante (figure 5) :

(A) le pont imidazolate entre Cu (II) et Zn (II) est libéré de la forme Cu (II) pendant la réduction par le premier $O_2^{\cdot(-)}$. Ce pont réduit donne alors un proton au second $O_2^{\cdot(-)}$ (B) qui réoxyde la forme Cu (I) (C).

Dans le cas de la SOD - Mn ou SOD - Fe, la forme trivalente du métal oscillerait de la même manière vers une forme divalente et réversiblement.

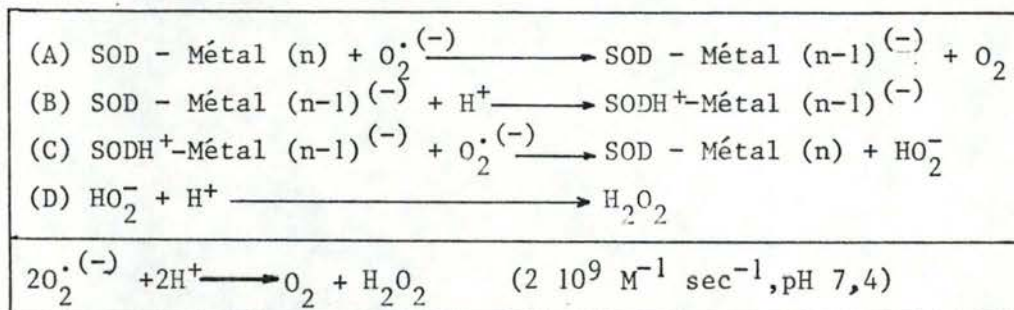


Figure 5 : suite de réactions proposées pour expliquer le mécanisme catalytique des SOD selon Richardson et Fee (Richardson et al. 1975; Fee et al. 1981)

Nous noterons encore que Dunbar et Johansen proposent l'His-61 impliquée dans une co-ordination unique avec le Zinc (II). Cette dernière co-ordination permet un "flipping" de l'His-61, cette "souplesse" du site actif pouvant jouer un rôle important dans l'efficacité de l'activité catalytique (Dunbar et Johansen, 1981).

Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide montrent que la SOD mitochondriale (SOD-Mn) migre plus lentement que la SOD

cytoplasmique (SOD-Cu Zn). Par isoélectrofocalisation, Koster et al. ont montré que la SOD-Cu Zn se localisait dans la région acide (pH 5-6) et présentait 2 ou 3 isoenzymes. La SOD-Mn se localise dans la région basique (pH 8-9,5) et présente au moins 3 isoenzymes (Koster et al. 1980; Keen et al. 1980).

La SOD-Mn des procaryotes est souvent dimérique (PM de 40.000) avec cependant des exceptions pour *Thermus aquaticus* et *Thermus thermophilus* où elle est tétramérique (PM de 80.000) (Sato et Harris 1977; Sato et Nakazawa 1978). Cette exception est généralisée chez les eucaryotes (Weisiger et Fridovich 1973 a et 1973 b, Ravindranath et Fridovich 1975; Salin et al. 1978; Mc Cord 1977). Les sous-unités sont identiques. La stoechiométrie du contenu en Manganèse varie cependant fortement entre 0,5 et 1 atome par sous-unité. Cette variation semblant liée à l'espèce étudiée (Mc Cord 1979 b).

La SOD - Fe, à l'exception du métal, est similaire à la SOD - Mn. Elle est dimérique, chaque sous-unité est identique mais présente aussi un problème stoechiométrique du Fer pour lequel les valeurs en nombre d'atomes sont comprises entre 0,5 et 1 par sous-unité (Mc Cord 1979 a et 1979 b).

2.6 Mécanisme de défense de la cellule contre l'oxygène

Comme nous venons de le voir, l'existence même des organismes aérobies met en jeu des interactions biologiques qui font intervenir des processus générateurs d'espèces chimiques hautement réactionnelles; ce qui oblige ces organismes à contrôler ces substances.

Le propos de ce chapitre est de rendre compte des mécanismes de défense cellulaire contre les dérivés réactionnels de l'oxygène et dans un second temps, de les inscrire dans une vision dynamique des processus cellulaires de sénescence (alinéas 2.7).

Nous pouvons de manière globale, considérer ces mécanismes à quatre niveaux d'action différents. Le premier serait de nature enzymatique, le second de nature hydrophobe, le troisième hydrophile, le dernier étant de type structural.

I. Niveau enzymatique

La majorité de l' O_2 utilisé par les organismes aérobies est réduit par le complexe cytochrome oxydase (Antonini et al. 1970). Britton et al. (1978) ont inhibé l'activité dismutasique de la SOD de *Streptococcus faecalis* et montré que 17% de l'oxygène consommé par ces micro-organismes était réduit de manière univale. La source majoritaire des $O_2^{(-)}$ reste inconnue à ce jour (Fridovich 1978 a et 1978 b; Del Maestro 1980).

L'action du complexe cytochrome oxydase (chaîne respiratoire), couplée à l'action de la SOD (Mc Cord 1969 b) et complétée par les activités catalasiques (Halliwell 1974, 1977, 1978) et peroxydasiques (Halliwell 1974), court-circuite la voie réductrice monovalente (Figure 6, (A)) et détourne les $O_2^{(-)}$ et l' H_2O_2 d'une activité potentielle dommageable pour la cellule (Figure 6).

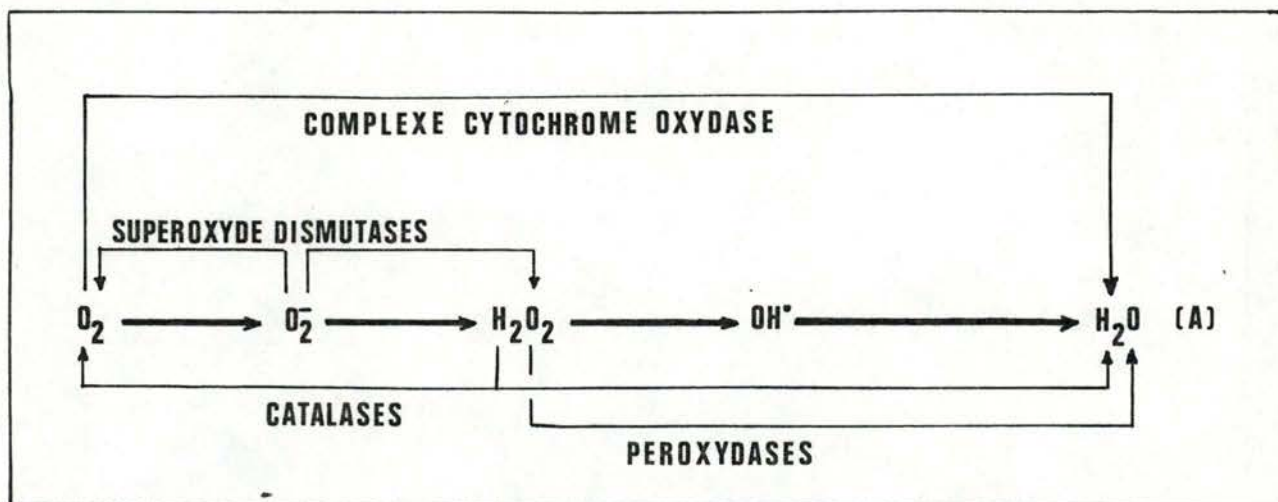


Figure 6 : Schéma des réactions enzymatiques prévenant l'accumulation d'intermédiaires réactionnels de la chaîne de réduction univalente (A) de l' O_2 moléculaire.

II. Niveau hydrophobe

Les tissus de mammifères contiennent de très grandes quantités d'acides gras polyinsaturés (AGP) localisés notamment dans les zones phospholipidiques des membranes cellulaires (Rouser et al. 1968). Ces molécules peuvent subir des peroxydations homolytiques par attaque radicalaire (Mead 1976) et conduisent à la destruction des membranes cellulaires et sub-cellulaires en général (Kellogg et Fridovich 1975 et 1977; Goldstein et Weissmann 1977; Thomas et al. 1978, Fong et al. 1973; Morgan et al. 1976; Brawn et Fridovich 1980).

Les radicaux hydroxyles et sans doute le singulet ($O_2^1 \Delta g$), réagissent avec ces lipides polyinsaturés (Kellogg et Fridovich 1977) pour former des radicaux peroxydes (ROO^{\cdot}), des hydroperoxydes ($ROOH$) et leurs dérivés comme la malondialdéhyde (figure 7).

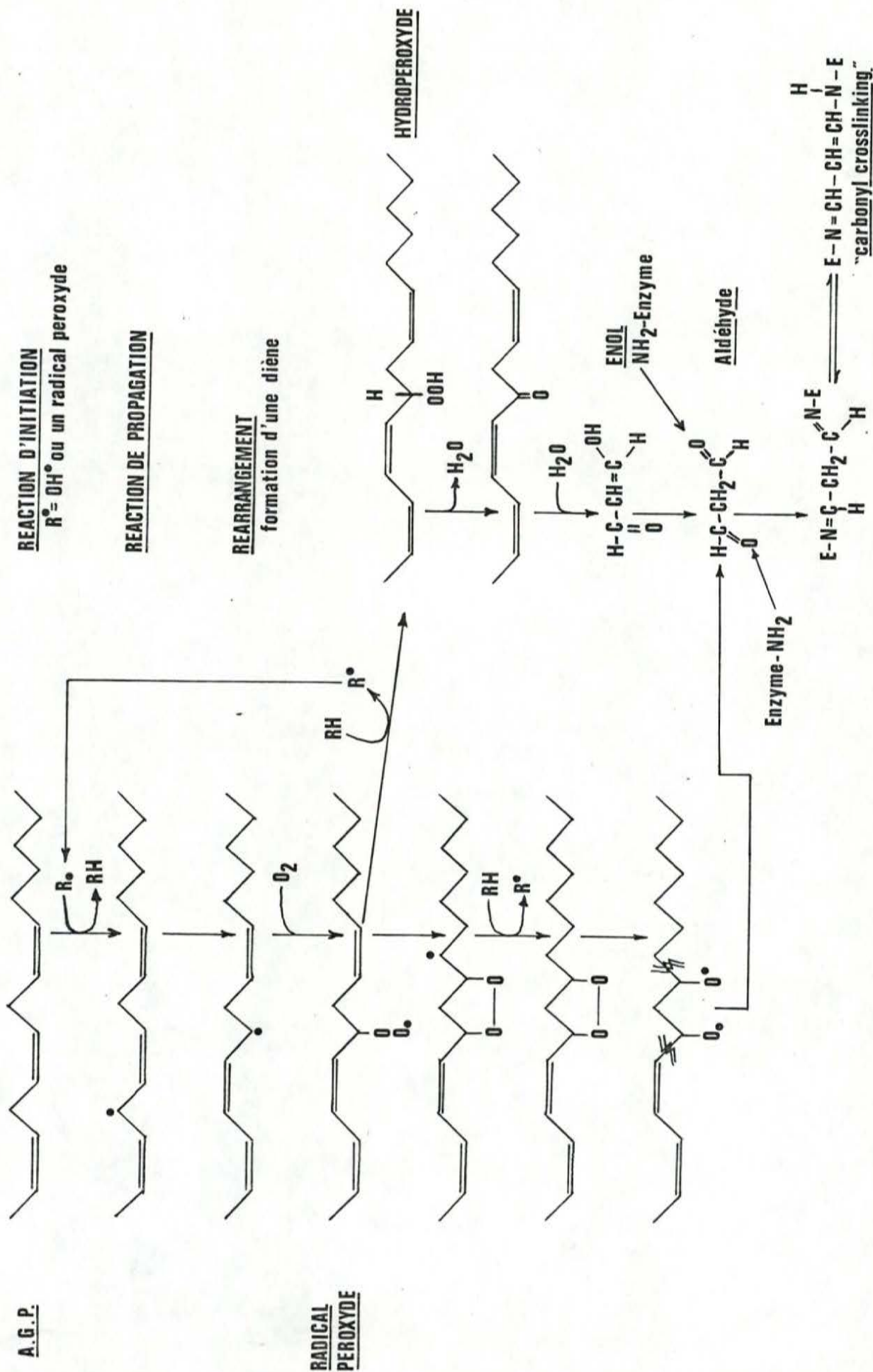


Figure 7 : voies de la peroxydation des lipides polyinsaturés d'après Dahle et al. (1962)

Cette dernière molécule est capable de provoquer des pontages ("cross-links") entre diverses molécules enzymatiques et former ainsi de multiples formes polymérisées (Tappel 1973).

A ce niveau, il existe des molécules hydrophobes comme l' α -tocophérol (vitamine E) qui, intercalées dans les membranes, bloquent les réactions de propagation de la peroxydation des lipides (Pryor 1976; Tappel et al. 1974; Halliwell 1978), bloquent $1'O_2^{(-)}$ et le singulet ($O_2^1 \Delta g$) (Halliwell 1978, Leibovitz et Siegel 1980, Nishikimi et Yagi 1977) et préviennent ainsi la formation de radicaux peroxydes. (Figure 8).

Il est intéressant de constater que l'oxydation d'une mole d' α -tocopherol en α -tocopheryl quinone peut réduire deux moles de radicaux ($R\cdot$). L'intermédiaire α -tocopheryl formé après la première oxydation peut être réduit par différents thiol - dont le glutathion - pour redonner l' α -tocopherol. Localisée en abondance dans les membranes subcellulaires des mitochondries, des microsomes et des chloroplastes, la vitamine E est bien destinée à capter les radicaux $O_2^{(-)}$ et les oxygènes singulets sur le lieu même de leur formation.

La glutathione peroxydase, évoquée au niveau enzymatique joue aussi un rôle fondamental dans la réduction des hydroperoxydes ($ROOH$) en hydroxyacides (ROH) et termine ainsi, la réaction en chaîne de peroxydation des lipides (Halliwell 1974).

Il a d'ailleurs été montré par Yang et Desai (1978) qu'il existait une relation fonctionnelle étroite entre l'activité de la vitamine E et la glutathione peroxydase (Figure 9).

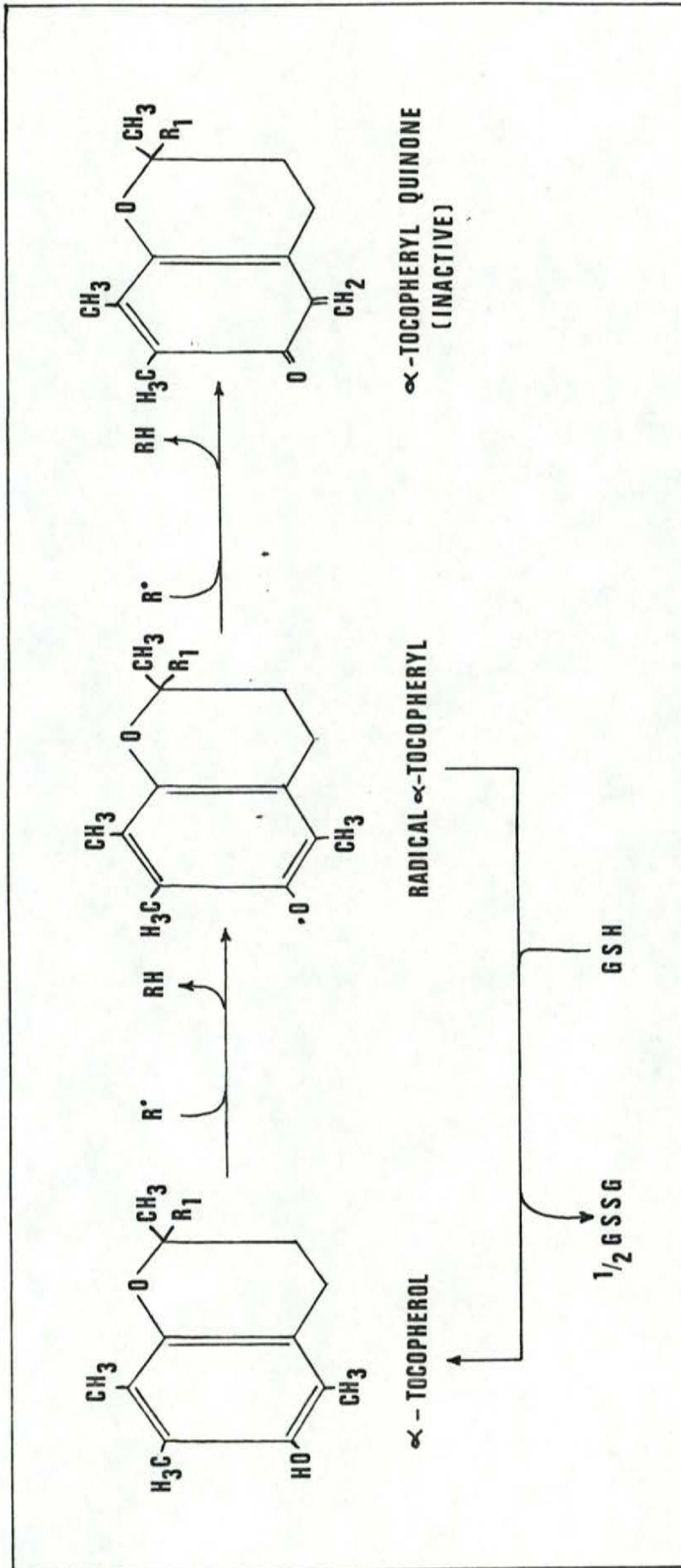
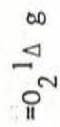
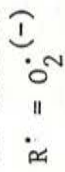


Figure 8 : voie de l'oxydation de la vitamine E (α -tocopherol) en d \acute riv \acute e quinone et recyclage du radical α -tocopheryl.



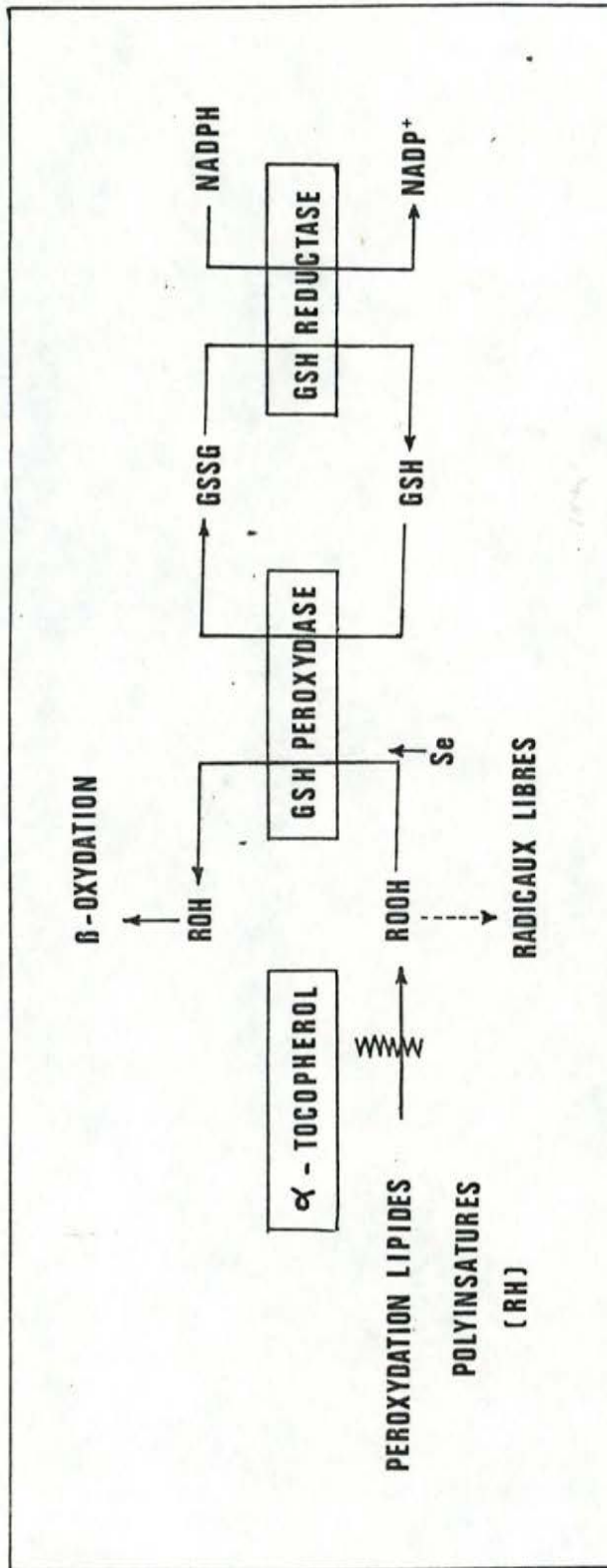


Figure 9 : Schéma illustrant les sites d'action de l' α -tocophérol et de la glutathione peroxydase dans le processus de peroxydation des lipides polyinsaturés (d'après Yang et Desai 1978)

III. Niveau hydrophile

Le mécanisme de défense au niveau hydrophile, comprend les molécules qui contrôlent les réactions productrices de radicaux dans les compartiments aqueux de la cellule. Ces molécules sont l'acide ascorbique (vitamine C) et le glutathion réduit (Pryor 1976; Nishikimi et Yagi 1977; Kosower et Kosower 1976; Halliwell 1978; Leibovitz et Siegel 1980).

L'acide ascorbique peut être oxydé par $1'O_2^{(-)}$ avec une constante de vitesse de $2,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Nishikimi et Yagi 1977). Cette constante semble faible à côté de celle traduisant la catalyse de la SOD ($2,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) (Klug et al. 1972; Rotilio et al. 1972). Cependant, l'importance de l'acide ascorbique réside dans le fait que sa concentration molaire dans les tissus est environ 7.000 fois supérieure à celle de la SOD (Leibovitz et Siegel 1980). De plus, la vitamine C peut capter les radicaux libres et notamment le radical hydroxyle (Fessenden et Verma 1978) (Figure 10).

La figure 10 illustre ce type de réactions; l'on constatera que la vitamine C est capable de détourner les radicaux peroxydes pour en faire des hydroperoxydes. Dechalet a également montré l'action directe de la vitamine C sur $1'H_2O_2$ (Dechalet et al. 1972).

Compte tenu du fait qu'approximativement 50% de l'acide ascorbique total chez le rat se retrouve dans le mucus qui recouvre l'épithélium respiratoire, on peut considérer que la vitamine C joue un rôle de défense contre les radicaux libres non seulement intracellulaires mais également extracellulaires.

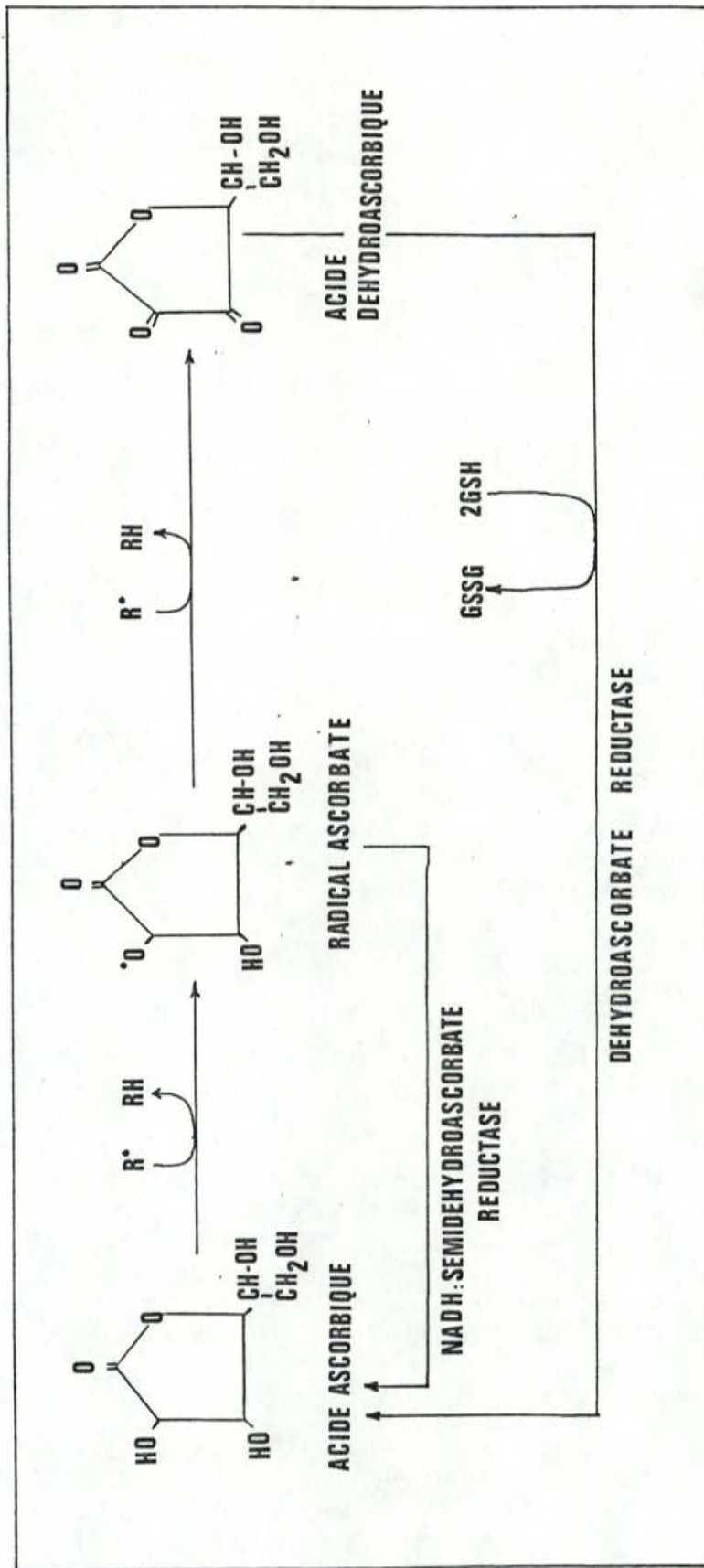
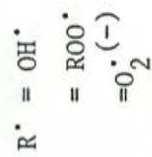


Figure 10 : oxydation et recyclage enzymatique de l'acide ascorbique d'après Fessenden et Verma (1978).

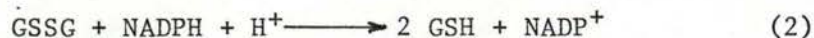


Le glutathion réduit (γ -glutamylcystéïnylglycocolle ou GSH)

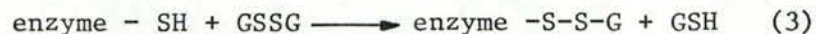
La cellule contient de fortes concentrations en GSH qui, par la réaction (1), peut empêcher l' O_2 d'oxyder des enzymes possédant des fonctions thiols (Haugaard 1968).



Le glutathion oxydé peut être reconverti en 2GSH par la glutathione réductase (réaction 2) avec utilisation du NADPH + H^+ comme réducteur. La position centrale de la glutathione réductase peut ainsi privilégier l'équilibre GSH/GSSG en le maintenant au mieux, à un niveau élevé (Jocelyn 1972; Halliwell 1978).



Il faut cependant remarquer que, dans des conditions particulièrement riches en O_2 , le rapport GSH/GSSG tombe très vite et entraîne la réaction (3); le GSSG à fortes concentrations inactive des enzymes en formant des disulphides (Rupniak et Quincey 1973). De plus, lorsque la cellule est forcée à produire du GSSG en grande quantité,



celui-ci est très rapidement expulsé à l'extérieur de la cellule (Sies et Summer 1975, Srivastava et al. 1974).

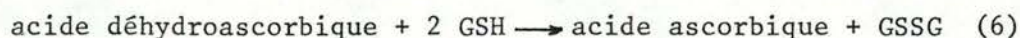
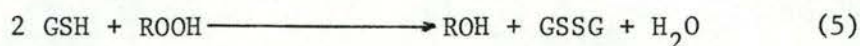
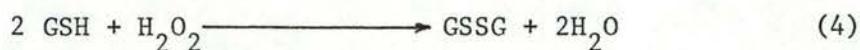
Enzymatiquement, le GSH peut servir :

1. à la glutathione peroxydase qui l'utilise comme substrat pour réduire l' H_2O_2 (réaction 4) et les hydroperoxydes (réaction 5) et préviendrait ainsi la formation de radicaux

peroxydes (Mc Cay et al. 1976).

2. à la déhydroascorbate réductase, régénératrice d'acide ascorbique (réaction 6).

Enfin, le GSH peut recycler (réaction 7) l' α -tocopherol par réduction du radical α -tocopheryl.



On remarquera donc que le GSH peut jouer un rôle dans la "détoxification directe" de l' O_2 moléculaire (réaction (1)), dans la "détoxification indirecte" par son action sur l' H_2O_2 et sur la peroxydation de lipides polyinsaturés (réactions (4),(5)) et dans le-recyclage de molécules impliquées dans ce même mécanisme de défense de la cellule contre l' O_2 (réactions (6), (7)). De plus, le glutathion oxydé (GSSG), résultat de toutes ces réactions est recyclé par la glutathione réductase en glutathion réduit (réaction (2)).

IV. Niveau structural

Ce niveau de défense est intimement lié à l'intégrité structurale de la cellule. Ainsi, on retrouvera la SOD et la glutathione peroxydase, à la fois dans le cytoplasme et la mitochondrie, la vitamine E dans les membranes subcellulaires, site des peroxydations homolytiques, la catalase dans la fraction soluble et les peroxysomes, le cholestérol qui par sa taille et sa structure, protège dans les membranes, les

doubles liaisons d'acides gras polyinsaturés (Demopoulos et al. 1972), le glutathion réduit et oxydé dans le cytoplasme, la vitamine C dans la fraction soluble et les liquides extracellulaires.

Cette situation "idéale" semble pour le moins contraster avec le milieu extracellulaire qui excepté pour la vitamine C, est pauvre en SOD et catalase (plasma, liquide cérébrospinal, fluide synovial) (Mc Cord 1974, Salin et Mc Cord 1977) et laisse la membrane plasmique sans défense apparente vis-à-vis de radicaux libres extracellulaires (Mc Cord 1974).

Nous présentons à la figure 11, un schéma récapitulatif des divers mécanismes de défense de la cellule contre l'oxygène moléculaire.

Nous soulignerons enfin l'importance capitale que prend le NADPH quant à son rôle premier dans ces mécanismes. Le NADPH est maintenu sous forme réduite, grâce à l'action de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase et de la 6-phosphogluconate déshydrogénase qui font partie des premières étapes du cycle des pentoses phosphates.

Il semble donc que la potentialité cellulaire à maintenir un pouvoir intracellulaire réducteur important est une condition indispensable à sa capacité de défense contre les dérivés de l'oxygène moléculaire et donc, à sa survie.

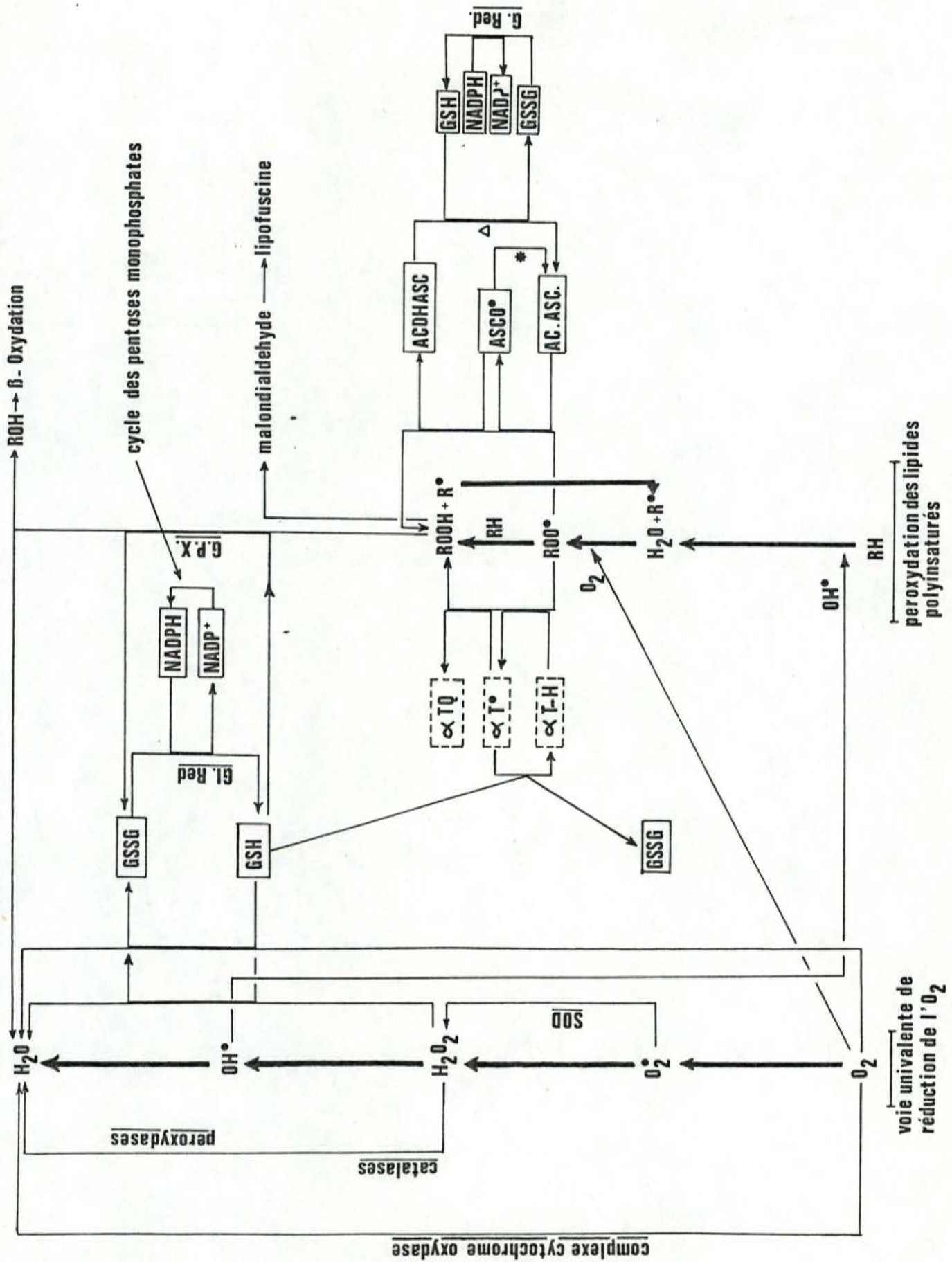


Figure 11 : (légende page 62)

Figure 11.

Schéma général du mécanisme de défense de la cellule contre les dérivés de l'oxygène.

O_2^{\bullet}	radical superoxyde	RH	lipides polyinsaturés
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène	R^{\bullet}	radical libre
OH^{\bullet}	radical hydroxyle	ROO^{\bullet}	radical peroxyde
SOD	superoxyde dismutase	$ROOH$	radical hydroperoxyde

Δ déhydroascorbate réductase

* NADH : *semidéhydroascorbate reductase

GPX	glutathione peroxydase	GSH	glutathion réduit
G.Red	glutathione réductase	GSSG	glutathion oxydé

AC.ASC. acide ascorbique (vit. C)

$ASCO^{\bullet}$ radical ascorbate

ACDHASC acide déhydroascorbique

αTQ α -tocopheryl quinone

αT^{\bullet} radical α -tocopheryl

$\alpha T-H$ α -tocopherol (vit. E)

2.7 Sénescence et défense de la cellule contre l'oxygène

Comme nous l'avons déjà souligné dans le premier chapitre, notre travail consiste à étudier la superoxyde dismutase au travers de la sénescence de fibroblastes WI-38 et d'aborder ainsi l'aspect dynamique du mécanisme de défense de la cellule contre les dérivés de l'oxygène moléculaire.

Quels arguments ont prévalu au choix de l'orientation prise par ce travail ?

2.7.1. Lipofuscine et vieillissement

Lorsque l'on regarde en microscopie optique des cultures de fibroblastes WI-38 jeunes et vieux, on est frappé par les différences élémentaires entre l'aspect de ces cellules (Hayflick 1977) (Photo 1).

Le volume des cellules augmente, passant de 2.000 à 2.700 μ^3 entre la génération 25 et la génération 45. Le nombre de cellules par unité de surface passe de ± 180.000 à $\pm 86.000/\text{cm}^2$ entre ces deux mêmes générations.

Le temps moyen pour une division s'accroît également passant d'environ 24 heures pour les jeunes à 48 et 72 heures pour les cellules âgées. Mais le plus remarquable dans le cadre de cette vision dynamique de la culture reste l'accumulation progressive de résidus appelés grains de lipofuscine (LPF). Au cours du vieillissement des cultures de cellules, il est possible de suivre cette accumulation progressive de LPF grâce à sa fluorescence (Deamer et Gonzales 1976).

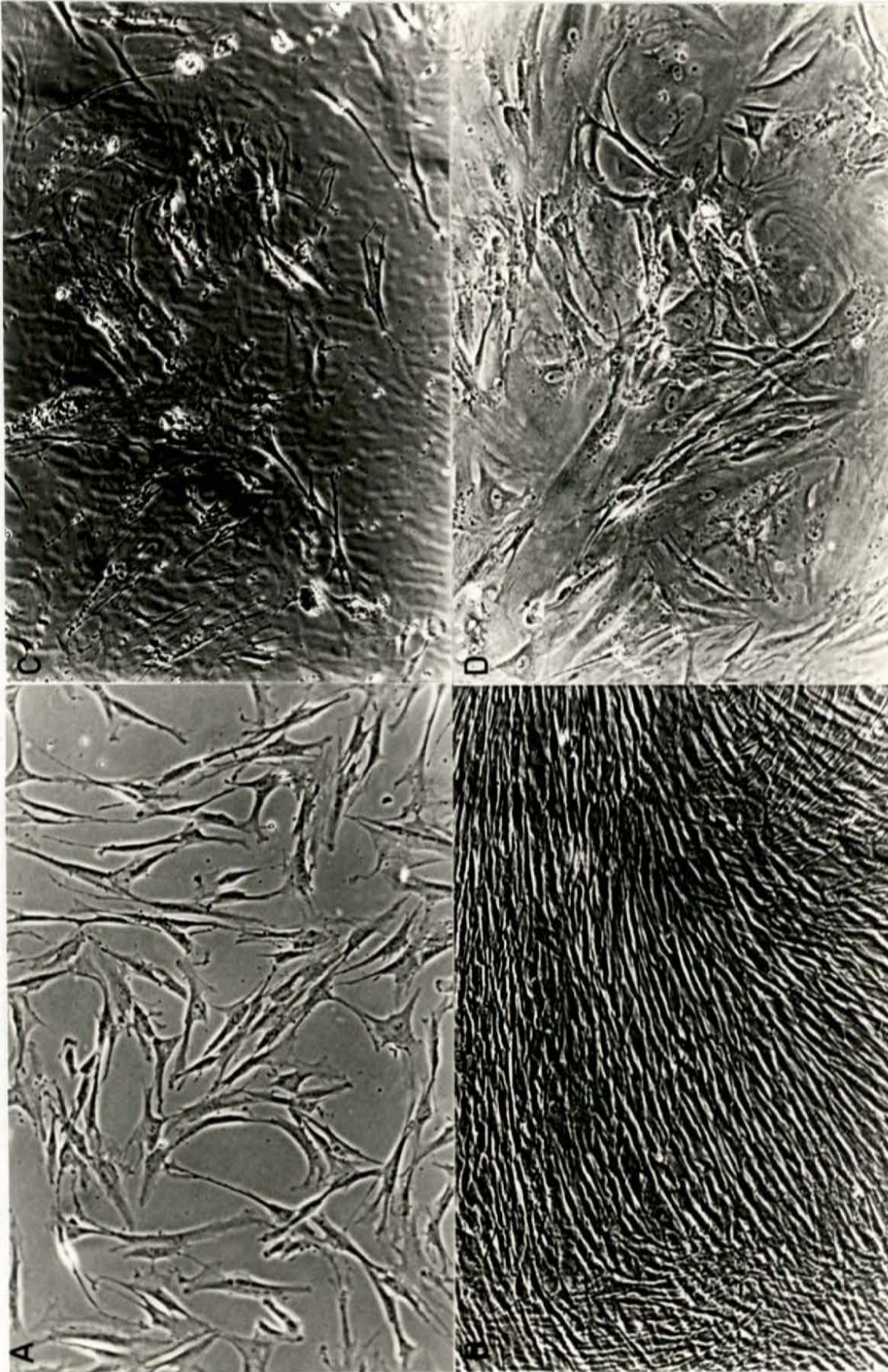


Photo 1 : Cellules WI-38 à la génération g28-g29.
A non confluentes
B confluentes

Cellules WI-38 à la génération g52-g53.
C non confluentes
D confluentes

Les travaux sur la relation entre vieillissement et accumulation de lipofuscine (LPF) ont débuté en 1886 (Koneff 1886). La lipofuscine est une substance hétérogène contenant : des lipides, des protéines et des résidus de structures inconnues résistant à l'hydrolyse acide (Björkerud 1964). Plusieurs auteurs pensent que les grains de LPF seraient l'expression visuelle d'un phénomène d'engorgement des lysosomes (Strehler et al. 1959; de Duve et Wattiaux 1966; Bourne 1973) et des mitochondries (Gopinath et Glees 1974). Il est important pour notre étude de constater que ce sont les peroxydations de lipides polyinsaturés (Tappel et al. 1974) qui sont à l'origine de la formation de lipofuscine. La fluorescence spécifique de celle-ci provient de la réaction entre une mole de malondialdéhyde et de deux moles de composés aminés qui produisent une structure chromophore (base de Schiff : $R-N = CH - CH = CH - NH - R$) dont le maximum d'émission se situe entre 430 et 450 nm pour une onde d'excitation située entre 345 et 360 nm (Hendley et al. 1963, Fletcher et al. 1973).

Ces grains de lipofuscine ont acquis très vite le surnom de "age-pigment" confirmé en cela par Strehler et al. (1959) qui établit une relation linéaire entre la quantité de lipofuscine de tissus myocardiques et l'âge des patients. De plus, des expériences réalisées "in vivo" et "in vitro" ont montré que la déficience en vitamine E, en selenium, en glutathione peroxydase, ou la mise en hyperoxie (Tappel et al. 1974; Hasan et Glees 1973; Flohé 1979; Kimball et al. 1976) conduisait à une accumulation très rapide de la lipofuscine alors que les conditions inverses (excès en vitamine E, selenium) freinaient considérablement sa production; d'après Packer et Fuehr (1977), la culture des cellules WI-38 en hypoxie augmentait légèrement le nombre maximum de générations atteint par ces cellules. Sur ces mêmes cellules

WI-38, Packer et Smith (1974) montraient que l'addition de 100 μg d' α -tocopherol par ml de milieu nutritif amenait les cellules à plus de 100 générations; les cellules normales atteignent au maximum 52 à 58 générations (Hayflick et Moorhead 1961; Hayflick 1965). Cependant, une contamination inconnue dans le sérum de veau fœtal utilisé par Packer n'est pas à exclure. Ainsi, il ne fut plus possible, avec d'autres lots de sérum, de reproduire cette expérience (Packer et Smith 1974).

Nous retiendrons de cette analyse sur la lipofuscine que la malondialdéhyde représente un marqueur du niveau d'intensité de la peroxydation des lipides polyinsaturés dans les cellules.

2.7.2 Comportements enzymatiques

A) En guise d'introduction, nous présenterons succinctement les résultats obtenus par Kimball et al. (1976) sur les tissus pulmonaires de rat soumis à une hyperoxie de 85 à 90 % en O_2 .

Après 7 jours d'exposition à 90 % d' O_2 (1 atm.), les auteurs ont montré que par rapport aux rats contrôles, les activités :

1. des SOD mitochondriale et cytoplasmique, augmentaient respectivement de 245 et 145 %,
2. la glutathione peroxydase et la glutathione réductase augmentaient respectivement de 317 et 175 %,
3. la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase augmentait de 413 %,
4. le glutathion réduit augmentait de 195 %,
5. les molécules non protéiques à groupements sulfhydryles augmentaient de 365 %.

Ces observations montrent de manière indirecte combien le système de défense contre l'oxygène réagit efficacement à des conditions de vie extrêmes en O_2 et expriment clairement la complémentarité des mécanismes mis en jeu pour protéger le poumon d'altérations irréversibles (figure 12).

B) Récemment, Hoffman et al. (1980) ont montré que l'adaptation à un environnement hyperoxique chez le rat nouveau né (>80% O_2) s'exprimait au niveau pulmonaire par l'adaptation de l'activité de la SOD, de la catalase et de la glutathione peroxydase. Cependant, ils ont noté que l'adaptation variait entre des jeunes rats de 10 jours et des rats de 25 jours. Pour les rats de 10 jours, l'augmentation de la SOD, de la catalase et de la glutathione peroxydase ne se produit respectivement qu'après 4, 6 et 12 heures de conditionnement pour atteindre un maximum après 6, 12 et 24 heures. Par contre, pour les rats de 25 jours, seules la catalase et la glutathione peroxydase répondent, et de manière très lente au conditionnement hyperoxique.

Ainsi, l'action synergique de la SOD, de la catalase et de la glutathione peroxydase est hiérarchisée, et la plus faible adaptabilité chez les rats de 25 jours explique leur plus grande sensibilité à un environnement hyperoxique drastique (Hoffman et al. 1980). Ces résultats sont en accord avec les conclusions tirées chez le rat adulte par Steven et Autor (1977) et Autor et al. (1976, 1979).

C) Les résultats obtenus à partir de l'étude du comportement d'enzymes liées aux mécanismes de défense contre l'oxygène au cours du vieillissement, montrent que ceux-ci s'altèrent ou voient leurs activités enzymatiques modifiées.

- La glucose-6-phosphate deshydrogénase et la 6-phosphogluconate deshydrogénase présentent une fraction enzymatique plus thermolabile dans les cellules vieilles (Holliday et

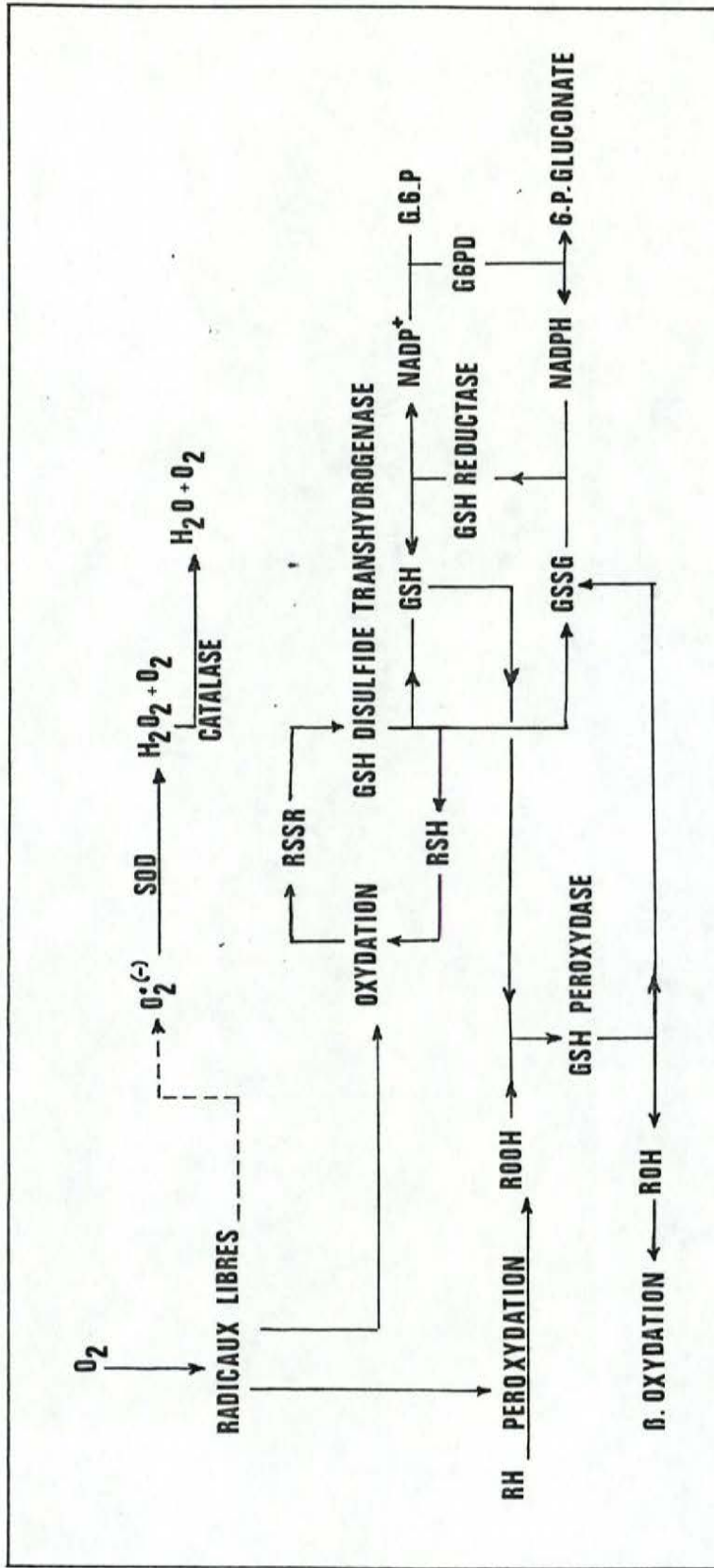


Figure 12 : Mécanisme synergique des actions enzymatiques antioxydantes proposées pour protéger les cellules pulmonaires des dommages liés à la production de $O_2^{\cdot(-)}$ et de peroxydes (d'après Kimball 1976).

al. 1974; Goldstein et Moerman 1975; Dreyfus et al. 1978).

- l'activité de la catalase mitochondriale et de la glutathione peroxydase dépendante du Se augmente au cours du vieillissement alors que la SOD mitochondriale reste inchangée (Nohl et al. 1979).
- Sur le cristallin de bœuf, Ohrloff et al. (1980) ont montré que les activités de la glutathione réductase et de la glutathione peroxydase, baissaient de plus de 50 % au cours du vieillissement. Ces mêmes enzymes présentent une thermolabilité nettement plus accentuée que les enzymes jeunes. Ces résultats sont en accord avec ceux réalisés sur le cristallin humain (Harding 1973).
- Un grand nombre de laboratoires se sont tournés vers l'étude de la SOD. Les résultats sont contradictoires. Ainsi, Reiss et Gershon (1976 b) montrent que l'activité de la SOD cytoplasmique de foie de rat chute dramatiquement, que sa thermolabilité est accrue et que son activité par unité d'antigène, décroît. "A contrario", Kellogg et Fridovich (1976) montrent que l'activité de la SOD dans le foie de rat reste inchangée (Kellogg 1976). Cette observation est identique à celle obtenue par Stevens et al. sur la SOD-Cu Zn d'érythrocytes humains de donneurs âgés (Stevens et al. 1975).
- Les résultats sur érythrocytes humains obtenus par Joenje et al. (1978) montrent également que l'activité SOD ne varie pas en fonction de l'âge du donneur et que l'activité enzymatique par unité d'antigène reste inchangée en fonction de l'âge.

Dans ce travail, nous utiliserons le modèle de vieillissement que constituent les cultures de fibroblastes de poumons d'embryons humains (cellules WI-38). Sur ce modèle, nous examinerons d'abord l'évolution de la capacité des lipides à être peroxydés avant d'aborder l'étude de la superoxyde dismutase. L'enzyme sera étudiée tant du point de vue quantitatif que du point de vue qualitatif. Etant donné la mise en évidence d'une forme "altérée" de SOD chez les vieilles cellules, nous développerons une série d'expériences destinées à mettre en évidence le mécanisme de cette "altération" et les facteurs qui l'influencent. Nous réintroduirons alors ces observations dans le cadre de la théorie généralisée d'Orgel (1973) et de l'hypothèse des modifications enzymatiques conformationnelles (Rothstein 1981) et post-traductionnelles (J-C. Dreyfus et al. 1978). Enfin, nous interprétons nos résultats dans le cadre de l'évolution au cours du vieillissement cellulaire, du mécanisme de défense de la cellule contre les dérivés de l'oxygène (Leibovitz et al. 1980).

CHAPITRE III - RESULTATS.

3.1 Bases historiques de la culture de cellule

En 1907, Ross G. Harrison (1907) présente un article : "Observations on the living developing nerve fiber" dans lequel il développe une méthode de "culture cellulaire". Il isole délicatement des morceaux d'embryon de grenouille, les plonge dans une goutte de lymphe fraîchement ponctionnée d'une grenouille adulte, isole le tout dans une petite chambre fermée par de la paraffine et les observe. Le résultat est stupéfiant : les cellules ainsi protégées, restent en vie au moins quatre semaines. De plus, elles se divisent et se différencient en réminiscence de leur développement embryologique normal. Harrison venait de vivre en quelques semaines ce qui allait provoquer 6 décennies plus tard une véritable révolution dans l'expérimentation biologique : la culture de cellule était née.

La culture de cellule créée, encore fallait-il pouvoir maintenir les cellules en vie et cela le plus longtemps possible et pourquoi pas..., indéfiniment ? En effet, en 1912, sortait une publication remarquée d'Alexis Carrel (1912) qui avait pour titre "On the permanent life of tissues outside of the organism". Son objectif scientifique et les moyens d'y arriver étaient clairement définis par ces mots : "the purpose of the experiments described in this article was to determine the conditions under which the active life of a tissue outside the organism could be prolonged indefinitely (...) the length of the life of a tissue outside of the organism could exceed greatly its normal duration in the body, because elemental death might be postponed indefinitely by a proper artificial nutrition".

Les expérimentations portèrent sur le tissu conjonctif, des fragments de cœur d'un fœtus de poulet âgé de 18 jours qui,

après trois mois de culture en milieu plasmatique, pulsait rythmiquement à 52 coups par minute.

Les conclusions étaient importantes :

1. le taux de croissance augmentait - dans certains cas - en rapport direct avec l'âge de la culture;
2. sans accidents notoires, la culture de cellules pouvait croître et vivre très longtemps,...
3. les fonctions cellulaires étaient maintenues en culture (battements cardiaques).

Ces conclusions, controversées et fausses parfois, allaient alimenter de nombreuses discussions philosophiques et scientifiques. Un grand progrès dans l'utilisation des cultures sera réalisé par la découverte et la commercialisation en 1940 d'antibiotiques à large spectre et longue durée d'action. Le problème de la contamination se réglant progressivement, les équipes de chercheurs purent alors se lancer davantage dans les mises au point de cultures spécifiques.

En 1948 : clonage de cellules de souris par Sanford et al. (1948).

En 1950 : début des essais de culture sur cellules humaines transformées (Gey et al. 1952).

En 1955 : sortie d'un article fondamental - écrit par E. Eagle (1955) sur les besoins nutritionnels de cellules de mammifères en culture.

C'est en 1961 que paraîtront les travaux remarquables de Hayflick et Moorhead (1961). Ces derniers posèrent les bases d'une méthode simple de culture de cellules humaines à partir de tissus normaux. Pas moins de 25 lignées fibroblastiques diploïdes humaines d'origine fœtale furent isolées et caractérisées par ces auteurs. Ainsi, ils proposèrent la description de l'histoire d'une culture de cellule par la succession de phases

spécifiques de l'âge cellulaire. Dans une première phase de croissance (phase I), les cellules libérées de la trame tissulaire originelle prolifèrent "in vitro" dans la bouteille de culture. Cette phase peut durer entre une et trois semaines. Elle se termine lors de la première confluence. A ce stade, les cellules sont enlevées et replacées dans 2 autres bouteilles (repiquage de cellules). La seconde phase (phase II) se caractérise par une multiplication cellulaire très rapide (exponentielle). D'une durée de 2 à 10 mois, cette phase demande des repiquages fréquents. Les cellules entrent alors progressivement dans une troisième phase caractérisée par une activité mitotique de moins en moins intense, par l'accumulation progressive de déchets intracellulaires et par une augmentation de la durée de division cellulaire; elle se termine par un arrêt complet des divisions et finalement par la mort des cellules. Cette phase III est considérée comme étant l'expression même du phénomène de sénescence au niveau cellulaire.

En fait, le phénomène de vieillissement est beaucoup plus que la seule perte de la capacité de prolifération des cellules. Les cellules d'individus âgés gardent en effet en culture un potentiel d'environ 20 divisions (Martin et al. 1970).

La sénescence serait surtout provoquée par les modifications fonctionnelles qui affectent les cellules en culture ou "in vivo", avant la perte du potentiel de division. La mort cellulaire ne serait que la conséquence ultime du dysfonctionnement de la cellule (Hayflick 1980).

La préservation des cellules par congélation à -196°C complète les avantages de la technique de culture cellulaire "in vitro" en offrant à l'expérimentateur l'occasion de stocker des cellules sans en altérer les caractéristiques fonctionnelles et structurales et en différant d'autant la mort cellulaire. *Impuissant à manipuler*

l'âge chronologique, l'homme se donnait le pouvoir de figer l'âge physiologique cellulaire.

En utilisant ce modèle de vieillissement, le chercheur se focalise sur les processus cellulaires. Cultivée "in vitro", la cellule présente une durée de vie limitée, corrélée avec l'âge de l'organisme donneur; elle offre la possibilité de contrôle d'un grand nombre de paramètres et permet les études systématiques d'effets pharmacologiques, biochimiques ou autres qui influencent la vie cellulaire.

3.2 Technique de culture des fibroblastes WI-38

Le milieu nutritif utilisé est composé du "milieu essentiel minimum de Eagle" (cfr. composition-tableau 6) et des "sels de Earle" (cfr. tableau 7), fourni par Eurobio (Paris, France). Ce milieu est tamponné à pH 7,2 par du bicarbonate de Na 0,03 M et additionné de 50 µg/ml d'auréomycine (Lederle, S.A., Belgique); Est encore ajouté à ce milieu, du sérum de veau fœtal (Eurobio, Paris, France) à raison de 10 % final.

Les cellules sont maintenues en culture dans des boîtes Falcon (C.A., USA) de 75 cm² ou dans des bouteilles en verre (roller bottle) de 600 cm² tournant à 0,25 r.p.m. dans une étuve à 37°C.

Le repiquage des cellules s'effectue - comme décrit par Hayflick (1965) - lorsque ces derniers sont à confluence. Il consiste à diviser en 4 le contenu de la boîte falcon initiale et de la répartir dans 4 autres boîtes. Dans le cas des bouteilles en verre, le repiquage se fait dans le rapport 1 : 2.

Débarrassées de leur milieu nutritif, les cellules sont lavées avec le milieu essentiel de Eagle seul (le sérum

inhibant l'action de la Trypsine) et incubées pendant 2 à 4 minutes en présence de Trypsine à 0,25 %. La trypsine enlevée, les cellules sont placées pendant 20 minutes à l'étuve (37°C). Les cellules se détachent de la paroi de la boîte, s'arrondissent et sont reprises dans un volume déterminé de milieu complet (milieu + sérum). Chaque boîte falcon contient environ 20 ml de milieu nutritif. Le repiquage se termine en enrichissant l'atmosphère des boîtes de culture en CO₂ (air sec / CO₂ - 95 % / 5 %).

Milieu essentiel minimum de Eagle

<u>Acides aminés</u>	g/l		g/l
L. arginine. HCl	0,1260	L. leucine	0,0524
L. cystine	0,0240	L. lysine HCl	0,0730
L. tyrosine	0,0360	L. méthionine	0,0150
L. histidine HCl. H ₂ O	0,0420	L. phénylalanine	0,0330
L. glutamine	0,2920	L. thréonine	0,0480
L. isoleucine	0,0525	L. tryptophane	0,0100
		L. valine	0,0470
<u>Vitamines</u>	g/l		
Choline. chlorure	0,0010		
Acide folique	0,0010		
I-inositol	0,0020		
D-Ca-pantothenate	0,0010		
Pyridoxal HCl	0,0010		
Riboflavine	0,0001		
Thiamine HCl	0,0010		
Nicotinamide	0,0010		
Biotine	0,0010		

Tableau 6 : Composition du milieu essentiel minimum de Eagle.

Sels de Earle

	g/l
NaCl	6,800
K Cl	0,400
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,266
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,200
Glucose	1,000
Rouge de phénol	0,010
NaHCO ₃	2,200
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,125

Tableau 7 : Composition en sels de Earle, du milieu essentiel minimum de Eagle.

3.3 Technique et résultats du dosage des radicaux libres

Les homogénats de cellules WI-38 sont préparés selon la méthode de Remacle et al. (1980) modifiée de la manière suivante : chaque boîte de culture est rincée trois fois dans 3 ml de tampon phosphate 10 mM - 0,15 M NaCl - pH 7,4 (tampon P.B.S.). Les cellules sont détachées de la paroi, resuspendues et homogénéisées dans un tampon 0,2 M tris - 0,16 M KCl - pH 7,4. Après passage à l'ultraturax (5 x 30 sec), nous appliquons les méthodes de Bernheim et al. (1948) et Placer et al. (1966) modifiées comme suit : à chaque ml d'homogénat, est ajouté 1,8 ml de solution 1,2 M d'acide trichloracétique (TCA) et 35 mM d'acide - 2 - thiobarbiturique (T.B.A.) à température ambiante. Les échantillons sont chauffés à 95°C à reflux pendant 25 minutes, refroidis à 0°C puis centrifugés 10 minutes à 5.500 rpm. La densité optique des surnageants est lue à 532 nm.

Le principe de ce dosage consiste à complexer une mole de malondialdéhyde (intermédiaire de l'oxydation par les radicaux libres des acides gras polyinsaturés) par 2 moles de T.B.A. (figure 13). Le complexe formé donne une coloration rouge dont l'absorption maximale se situe à 532 nm. L'étalonnage a été réalisé à partir d'une solution stock de malondialdéhyde (MDA) diluée dans l'éthanol. Les dilutions ultérieures sont réalisées dans l'eau bidistillée (figure 14).

Dans un second temps, nous avons déterminé à différents âges de la culture cellulaire, la quantité de MDA détectable dans les cellules WI-38. Pour ce faire, les tests ont été effectués sur des populations cellulaires dont les générations respectives étaient : g34-g35, g48-g49, g50-g51 (figure 15).

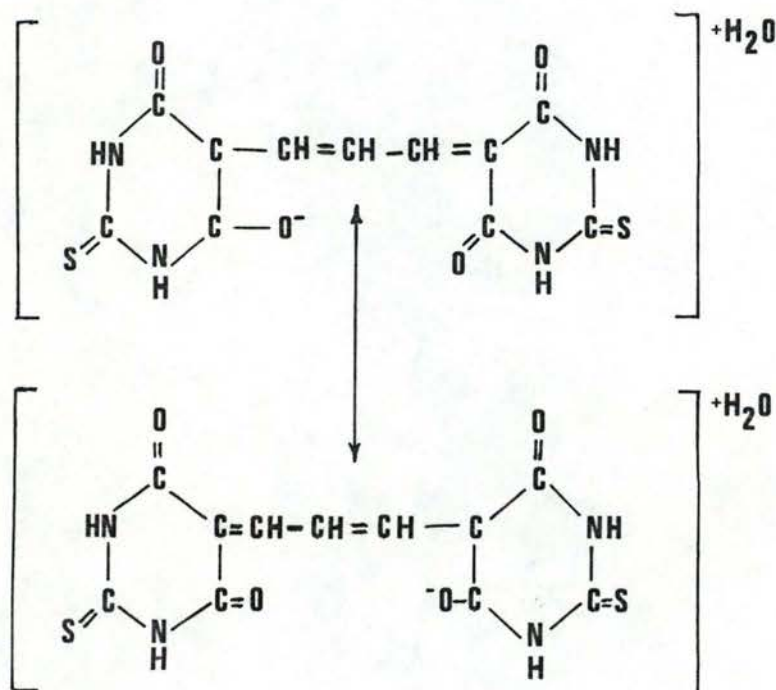


Figure 13 : formes de résonance du complexe obtenu par réaction de 2 molécules d'acide-2-thiobarbiturique avec 1 molécule de malondialdéhyde (d'après Barber et Bernheim 1967).

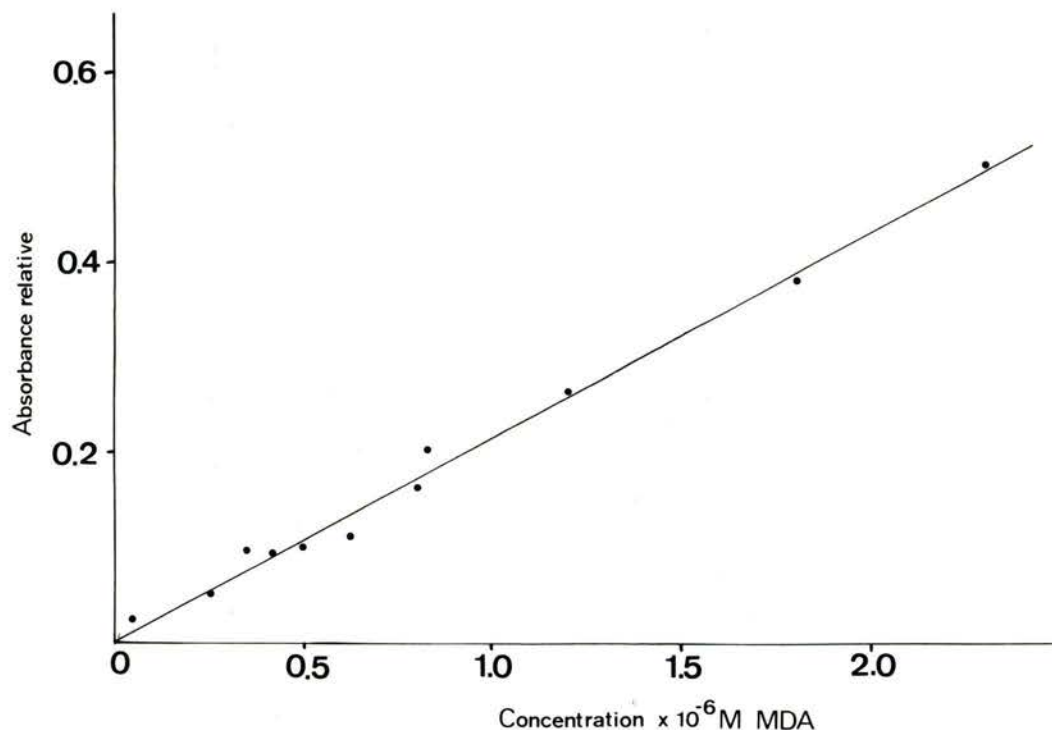


Figure 14 : courbe d'étalonnage donnant les densités optiques à 532 nm (absorbance relative) lorsque le dosage est réalisé en fonction de concentrations croissantes en Malondialdéhyde (MDA).
 $y = -0,0012 + 0,214 x$, $r = 0,998$.

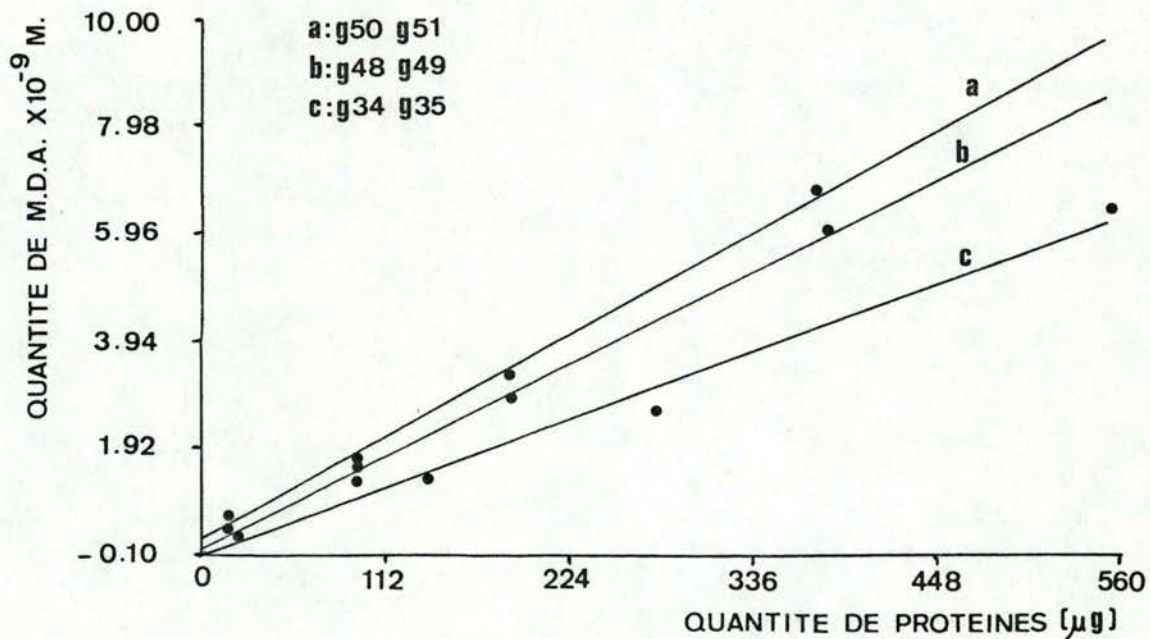


Figure 15 : relation entre la production de malondialdéhyde par des quantités croissantes de protéines cellulaires jeunes (g34-g35) et âgées (g48-g49, g50-g51).
 $a : y = 0,138 + 0,018 x$ $r = 0,998$
 $b : y = 0,037 + 0,016 x$ $r = 0,999$
 $c : y = -0,069 + 0,011 x$ $r = 0,994$

Des observations réalisées ci-dessus (figure 15), nous constatons que les pentes des droites g34-g35 et g48-g49; g34-g35 et g50-g51, sont significativement différentes ($\alpha = 0,005$). Les pentes des droites g48-g49 et g50-g51 ne sont pas significativement différentes entre elles ($\alpha = 0,005$). Par extrapolation de ces droites, nous estimons les quantités de MDA produites par mg de protéines et par cellules (intervalle de confiance à 99,5 %).

Cellules	MDA 10^{-9} M/mg.	MDA 10^{-9} M/ 10^6 cellules
g34-g35	11,331 \pm 1,267	3,333 \pm 0,374
g48-g49	15,528 \pm 0,459	5,972 \pm 0,176
g50-g51	17,440 \pm 0,999	24,914 \pm 1,427

Nous constatons dans les limites de l'analyse effectuée que le processus de dégradation des acides gras polyinsaturés croît au cours de la sénescence des fibroblastes. Ce processus est fortement marqué pour les cellules g50-g51 qui étaient au moment du dosage, à la limite extrême de viabilité.

3.4 Analyse de la superoxyde dismutase

Face à une production de malondialdéhyde qui augmente en fonction de l'âge cellulaire, nous nous sommes interrogé sur l'évolution de la première enzyme impliquée dans le mécanisme de défense de la cellule contre les dérivés de l'oxygène : la superoxyde dismutase (SOD).

3.4.1 Dosage de la superoxyde dismutase (SOD)

La détermination de l'activité dismutasique de la SOD (EC 1.15.11) est réalisée par la mesure de l'inhibition de la formation d'adrénochrome (I.F.A.) à partir de l'épinéphrine dans le système xanthine+xanthine oxydase, générateur de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot(-)}$).

Cette méthode, décrite par Mc Cord et Fridovich (1969 b), Misra et Fridovich (1972) et Nohl et Hegner (1978) a été appliquée avec les caractéristiques suivantes :

chaque test (1 ml) contient $1 \cdot 10^{-4}$ M épinephrine, $1 \cdot 10^{-4}$ M xanthine et $1 \cdot 10^{-8}$ M xanthine oxydase, 2 mM EDTA, 0,25 M sucrose et 20 mM triéthanolaminohydrochloride ajusté à pH 9,0. (tampon S.E.T.) A 25°C , la production moyenne de radicaux superoxydes dans le test est de $13,87 \pm 2,58$ nMoles/min. (moyenne \pm 2 s.). La formation d'adrénochrome est suivie à 480-575 nm au spectrophotomètre Perkin-Elmer 557-DW (Hitachi Ltd. Tokyo, Japon). Le coefficient d'extinction est de $2,86 \text{ nM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Par convention, nous définissons une unité d'activité "superoxyde dismutase" comme étant la quantité d'enzyme inhibant à 50 %, l'oxydation de l'épinephrine en adrénochrome à 25°C dans la méthode décrite ci-dessus. Sous ces conditions, 50 % d'inhibition est observée en présence de 2,5 μg de superoxyde dismutase purifiée à partir d'érythrocytes humains (sigma). La même détermination a été réalisée à partir de mitochondries "soniquées" de cœurs de rat chez le Dr. Nohl (Institut für Pharmacologie, Fachbereich Tiermedizin der Universität - Munich) (figure 16).

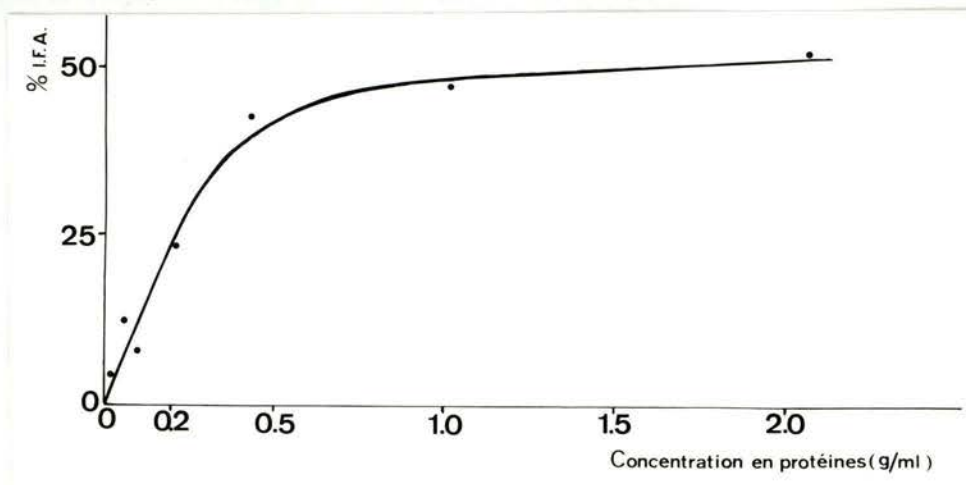


Figure 16 : courbe du pourcentage d'inhibition de la formation d'adrénochrome (% I.F.A.) dans le système générateur d' $\text{O}_2^{\cdot -}$ (xanthine+xanthine oxydase) en présence de concentrations croissantes en mitochondries "soniquées" de cœur de rat.

3.4.2 Courbe de pH (figure 17)

La superoxyde dismutase d'érythrocytes humains (SOD-Cu Zn) purifiée par sigma selon la méthode de Mc Cord et Fridovich (1969 b) a été utilisée pour déterminer le pH et le tampon adéquat pour déterminer l'activité optimale de l'enzyme. Trois tampons différents ont été utilisés pour effectuer la courbe d'activité en fonction du pH.

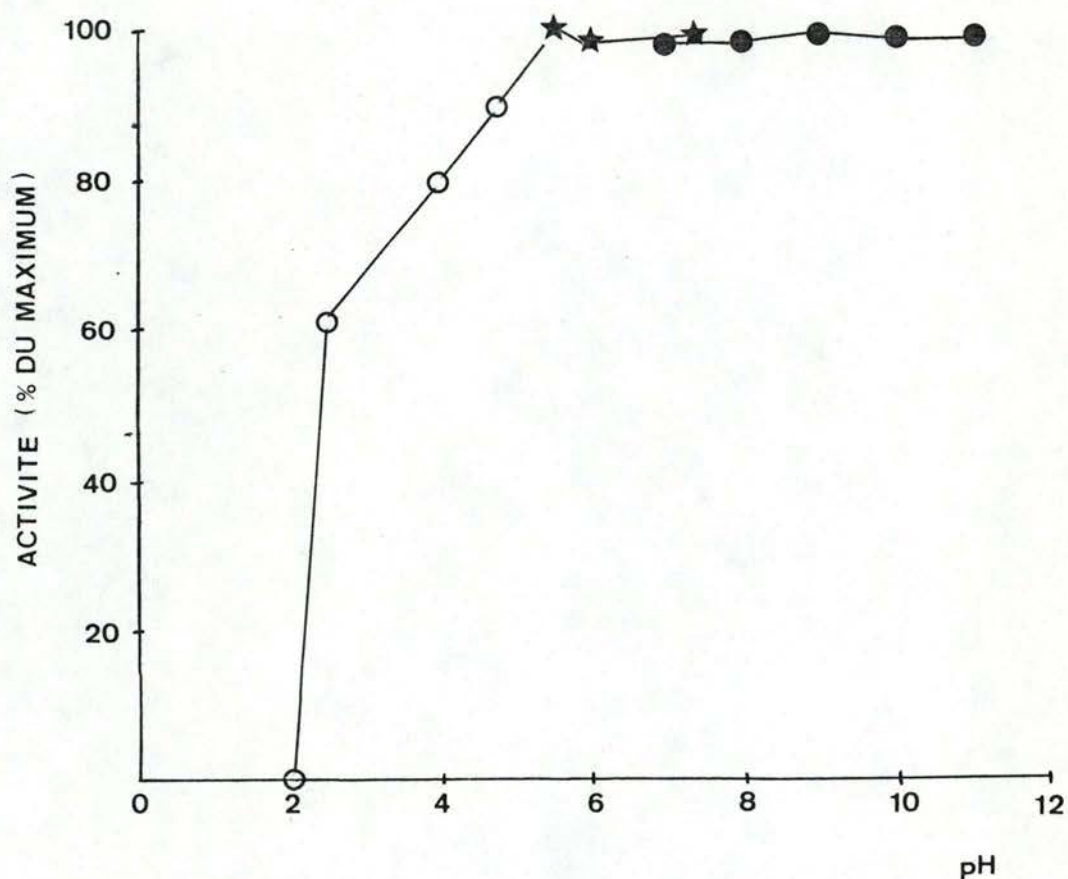


Figure 17 : courbe d'activité de la SOD en fonction du pH réalisée à partir de 0,8 U. d'activité SOD à 25°C.

- : tampon citrate de sodium 20 mM
- ★ : tampon phosphate (KH_2PO_4 - K_2HPO_4) 20 mM
- : tampon triéthanolaminohydrochloride 20 mM, EDTA 2 mM, sucrose 0,25 M (milieu S.E.T.).

Nous avons choisi de travailler 1) avec le tampon S.E.T. du fait que l'enzyme présente dans celui-ci une activité maximale et stable. 2) à pH 9,0. Il s'agit là d'une condition propre au tampon utilisé et largement rencontrée dans la littérature.

3.4.3 Courbe de température (figure 18)

L'analyse de la thermolabilité d'une enzyme étant un élément important dans la Biochimie de la sénescence, nous avons déterminé la courbe de température de la SOD de la manière suivante :

L'enzyme purifiée (0,8 unité d'activité) a été dosée dans le milieu S.E.T. après avoir été préalablement incubée pendant 25 min. à différentes températures. On remarquera la grande résistance de l'enzyme à la température puisqu'elle conserve encore 95 % de son activité à 60°C. Par la suite, toutes les courbes de thermolabilité seront effectuées à 70°C. de manière à obtenir une décroissance significative de l'activité enzymatique en fonction du temps.

3.4.4 Dosage de la SOD dans les cellules WI-38

La préparation des homogénats a été réalisée de la manière suivante :

1. les cellules sont rincées trois fois dans un tampon 0,9 % NaCl - 10 mM phosphate pH7,4 (tampon PBS), puis deux fois dans une solution 0,25 M sucrose - 1 mM EDTA, pH 7,4.
2. Détachées de la paroi, les cellules sont centrifugées 10 minutes à 600 g et resuspendues dans le milieu S.E.T.
3. Après 20 homogénisations au dounce serré (7 ml - Kontes Glass C°. Vineland, NY.), la suspension est centrifugée à l'ultracentrifugeuse Beckman (Model L5-65) 30 minutes à 39.000 rpm. dans le rotor 40 (Beckman Instruments Inc., Spinco division, Palo Alto, Californie).

4. Le surnageant est appelé "fraction cytoplasmique". Le culot est resuspendu dans le milieu SET pH 9,0 et "soniqué" 4 x 30 secondes; cette fraction est appelée "fraction mitochondriale".

Les figures 19 et 20 illustrent les activités de la SOD exprimée en % d'inhibition (% I.F.A.) en fonction de la concentration en protéines dans le test à partir d'un surnageant (figure 19) et d'une fraction mitochondriale (figure 20) de cellules WI-38 à la génération g36-g37.

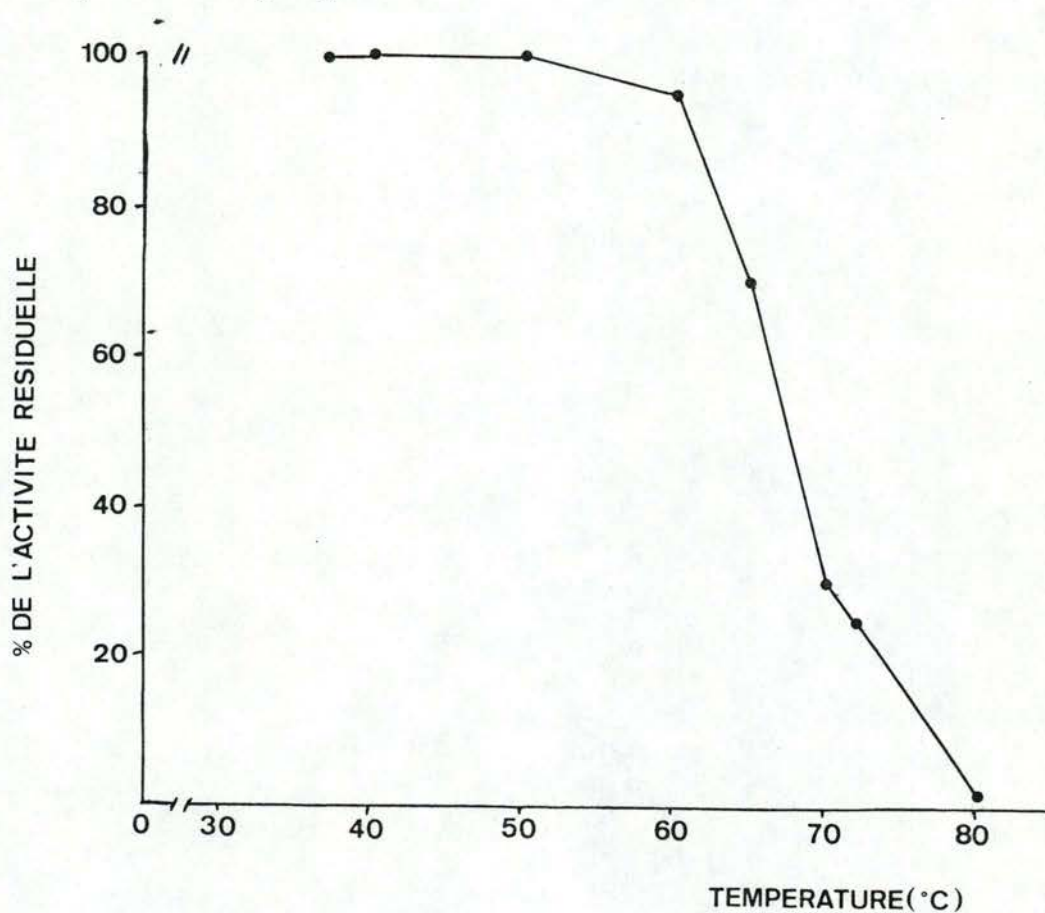


Figure 18 : courbe de température de la SOD-Cu Zn humaine purifiée après incubation pendant 25 minutes dans un tampon S.E.T. pH 9,0 à différentes températures.

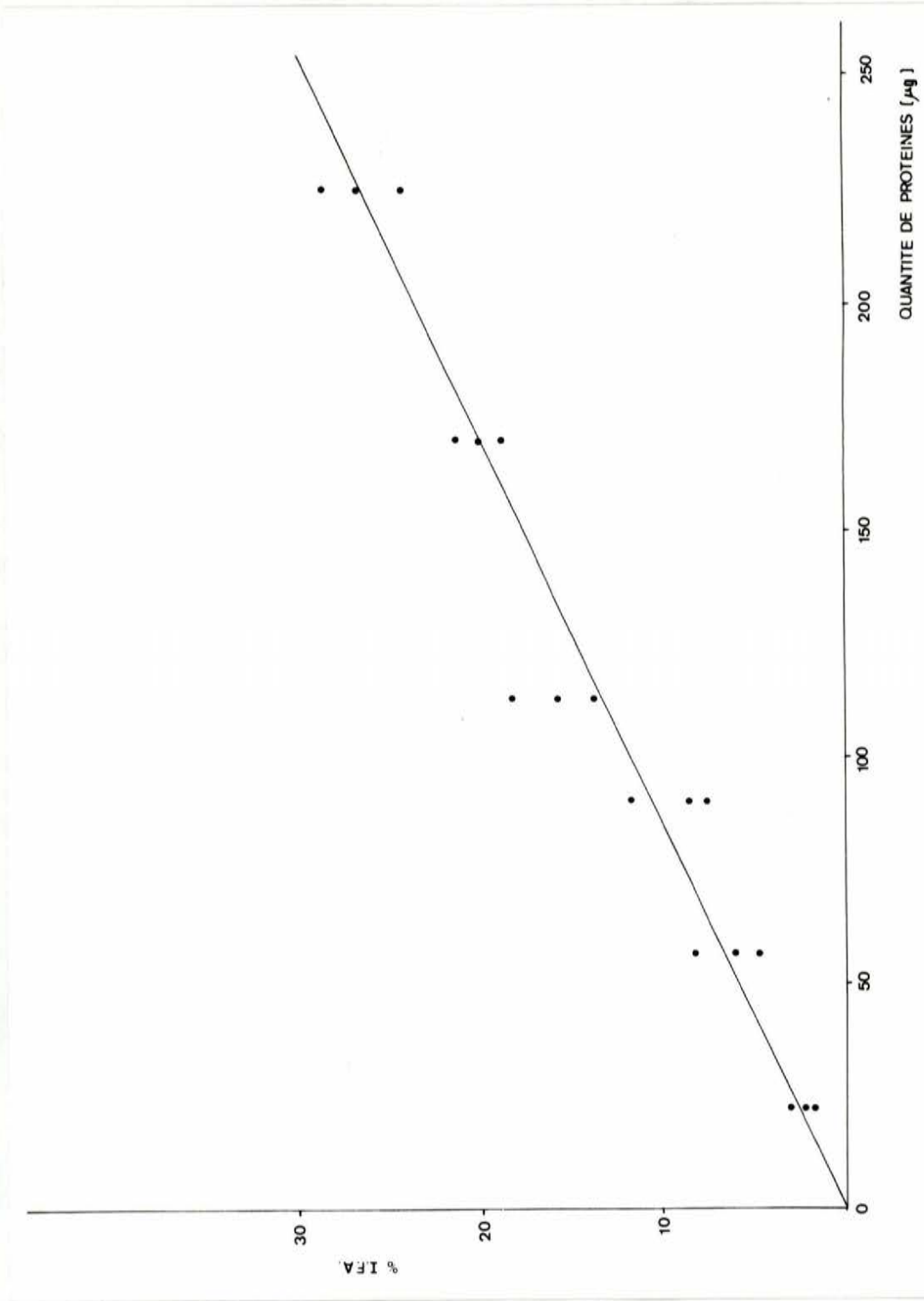


Figure 19 : étalonnage de l'activité dismutasique (% I.F.A.) du cytoplasme de cellules WI-38 g36-g37 en fonction de la quantité de protéines dans le test à 25°C. dans le tampon S.E.T. pH 9.
 $y = -0,41 + 0,128 x$ $r = 0,964$.

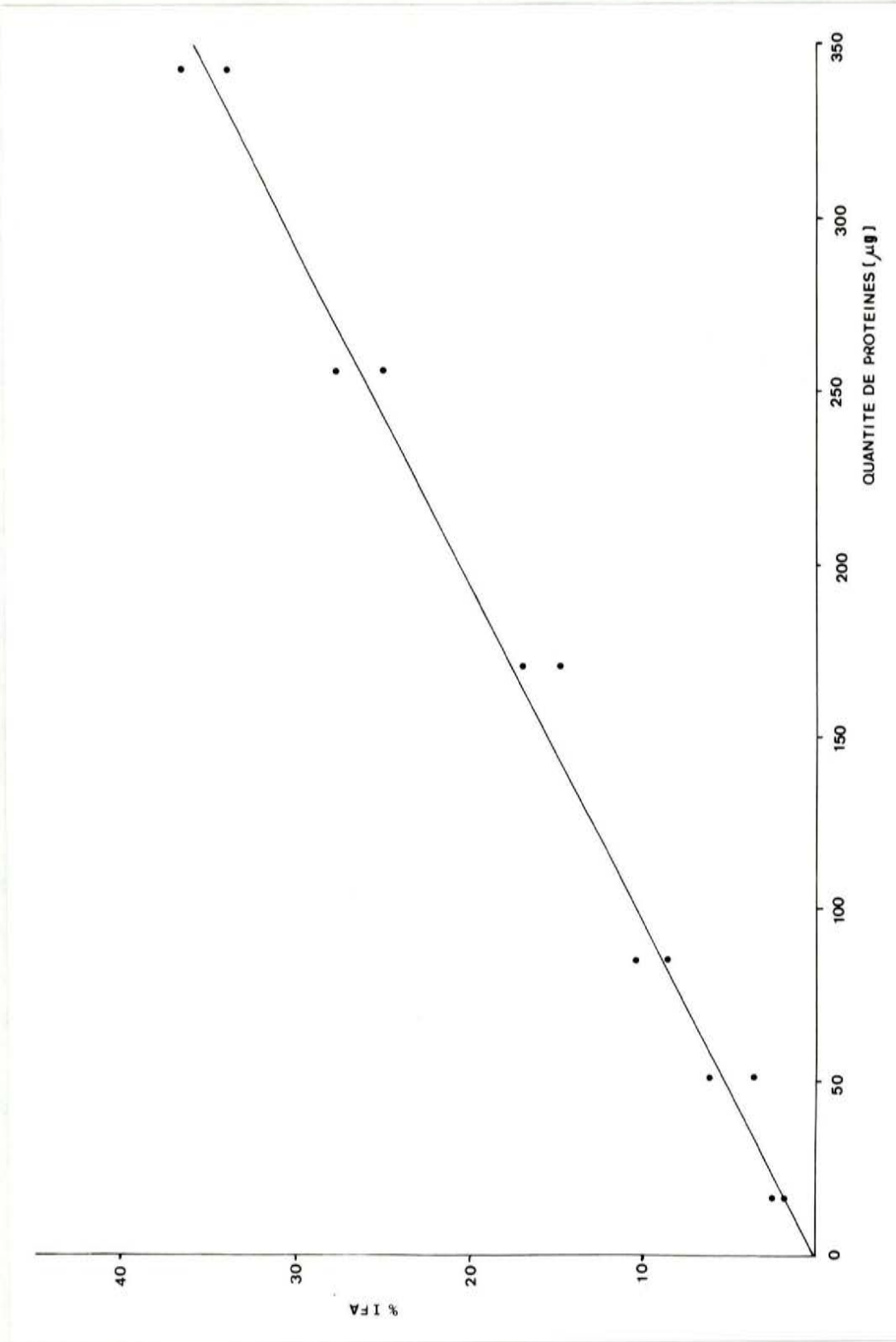


Figure 20 : étalonnage de l'activité dismutasique (% I.F.A.) de la fraction mitochondriale de cellules WI-38 g36-g37 en fonction de la quantité de protéines dans le test à 25°C. dans le tampon S.E.T. pH 9.
 $y = -0,023 + 0,102 x$, $r = 0,994$.

3.4.5 Mise en évidence de la SOD cytoplasmique et mitochondriale dans les cellules WI-38

a) électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les gels d'électrophorèse ont été réalisés selon la méthode de Davis (1964). L'activité de la superoxyde dismutase a été mise en évidence par la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971). Cette dernière méthode appliquée ici, consiste en une coloration négative de l'activité dismutasique selon le protocole expérimental suivant : chaque gel est placé 20 minutes dans une solution de bleu de tétrazolium $2,45 \cdot 10^{-3}$ M, tamponnée à pH 7,4 par du phosphate 0,1 M puis incubée 15 minutes dans du tampon phosphate 0,036 M pH 7,8 contenant du Tetraméthyléthylènediamine (TEMED) 0,028 M et de la riboflavine $2,8 \cdot 10^{-3}$ M ; la révélation s'effectue par illumination des gels pendant 15 minutes. Le système photochimique riboflavine-lumière produit des radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ qui, réagissant avec le bleu de tétrazolium, produisent le bleu de formazan (couleur bleue). La localisation de la SOD apparaîtra par une bande non colorée puisque les radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ seront détruits par le SOD et ne pourront donc pas réagir avec le bleu de tétrazolium. La coloration du gel étant faible et non stable, nous avons dû schématiser les résultats des électrophorèses dans la figure 21.

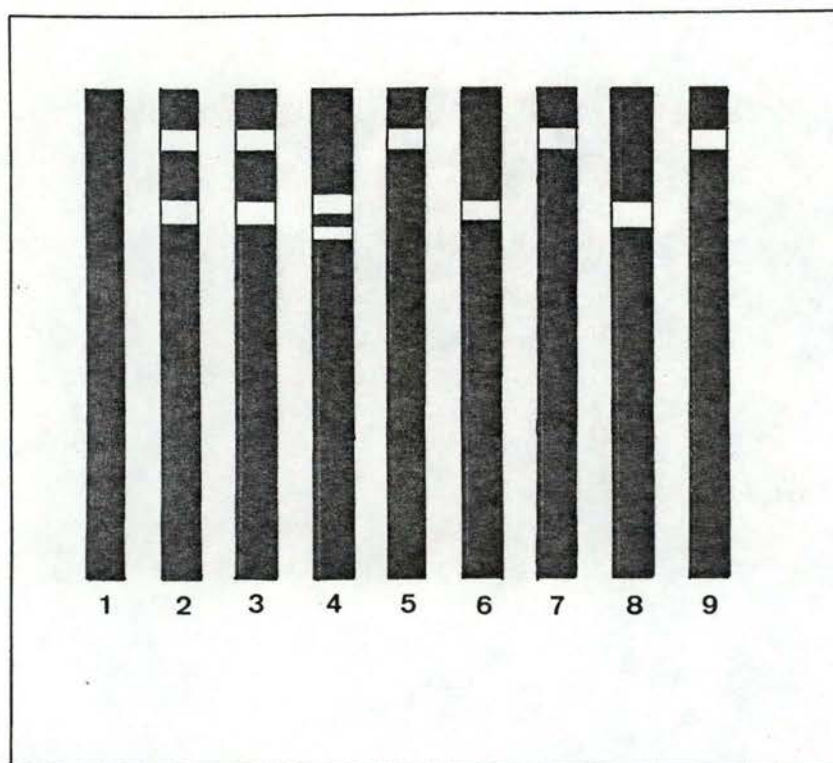


Figure 21 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de divers échantillons et mise en évidence de la SOD par la méthode de coloration négative décrite par Beauchamp et Fridovich (1971).

Un courant de 2,5 mA par gel est appliqué pendant 30 minutes puis porté à 4 mA par gel pendant 180 minutes (sous réfrigération). En présence de KCN 15 mM, la SOD-Cu Zn (cytoplasmique) est inhibée.

- 1 - contrôle
- 2 - Homogénat cellules WI-38, g20-g21 (100 µg protéines)
- 3 - Homogénat cellules WI-38, g46-g47 (100 µg protéines)
- 4 - SOD-CU Zn d'érythrocytes humains (Sigma) 5 µg.
- 5 - "fraction mitochondriale" cellules WI-38, g20-g21 (50 µg protéines)
- 6 - "fraction cytoplasmique" cellules WI-38, g20-g21 (")
- 7 - "fraction mitochondriale" cellules WI-38, g46-g47 (")
- 8 - "fraction cytoplasmique" cellules WI-38, g46-g47 (")
- 9 - Homogénat cellules WI-38, g20-g21 (100 µg protéines) traité avec du KCN 15 mM.

Nous constatons que les centrifugations différentielles d'homogénats de cellules WI-38 jeunes ou vieilles, permettent une séparation entre les SOD cytoplasmiques et mitochondriales (gels 2, 3, 5, 6, 7 et 8).

La SOD-Cu Zn (cytoplasmique) migre rapidement par rapport à la SOD-Mn (mitochondriale) (gels 5, 6, 7 et 8) (Koster et al. 1980).

De plus la localisation de la SOD-Cu Zn est caractérisée par une inhibition sélective au KCN 15 mM. (gel 9) (Simonyan et Nalbandyan 1972; Fee et Dicorleto 1973).

Enfin, il semble que la sénescence n'implique pas la modification de la mobilité électrophorétique de la SOD-Cu Zn et de la SOD-Mn (gel 2 et 3, 5 et 7, 6 et 8). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Reiss et Gershon (1976 b).

Cependant, Peeters-Joris et al. (1975) ont montré en accord avec Weisiger et Fridovich (1973 a, 1973 b), que l'on devait admettre une triple localisation de la SOD :

- une SOD-Cu Zn cytoplasmique
- une SOD-Mn mitochondriale (matricielle ou liée à la membrane interne).
- une SOD-Cu Zn dans l'espace inter-membranaire mitochondrial.

Afin de mettre en évidence cette triple compartimentation de la SOD et répondre au problème de l'existence d'isoenzymes cytoplasmiques et mitochondriales (Koster et al. 1980), nous avons réalisé des préparations de membranes mitochondriales qui ont été analysées par électrofocalisation.

b) Isolement des compartiments mitochondriaux

Une fraction mitochondriale (ML) de cellules WI-38 est isolée à partir d'un homogénat préparé dans une solution contenant du sucrose 70 mM, du D-Mannitol 0,21 M, de l'EDTA 0,1 mM et du tris-HCl 1 mM tamponné à pH 7,2. Les mitochondries sont resuspendues dans du tampon phosphate 20 mM pH 7,2 contenant 0,2 % d'albumine bovine. Cette étape provoque le gonflement des mitochondries qui, homogénéisées par 7 passages dans un dounce serré et recentrifugées 30 minutes à 40.000 rmp donneront un sédiment "Matrices mitochondriales" et une fraction soluble contenant les enzymes de l'espace intermembranaire. Le sédiment "Matrices mitochondriales" est alors "soniqué" 4 x 30 secondes et resuspendu dans un même tampon. Notre objectif étant essentiellement qualitatif, nous n'avons pas examiné en détail le rendement de cette technique développée par Parson et al. (1966) pour les mitochondries de foie de rat.

c) Technique d'électrofocalisation appliquée aux cellules WI-38

Décrit par Lönnerdal et al. (1979), Keen et al. (1980) et Marklund et al. (1976), les SOD cytoplasmiques et mitochondriales de foie de rat, présentent des points isoélectriques diamétralement opposés : les isoenzymes de la SOD-Cu Zn ont des points isoélectriques compris entre 4,5 et 5,5 ou entre 5 et 6 (Koster et al. 1980). Ces données nous ont amené à entreprendre l'analyse qualitative de la localisation des isoenzymes des SOD de cellules WI-38 en appliquant l'électrofocalisation selon la méthode de Vesterberg (1973). Deux solutions sont d'abord préparées : la solution stock en gel (Solution I) contient 9,7 g d'acrylamide et 0,3 g de bisacrylamide par 100 ml d'eau bidistillée. La solution polymérisante (solution II) contient 40 ml de glycérol, 0,1 ml de TEMED et 141 ml d'eau bidistillée. Dans une première étape, 15 ml de solution I sont ajoutés à 1,9 ml d'ampholytes (40 %) et 13,1 ml de solution II.

Après mélange et dégazage sous pompe à vide pendant 15 minutes, on ajoute 0,3 ml d'une solution fraîche de persulfate- NH_4 (40 mg/ml). La solution est alors coulée entre 2 plaques de verre silannés. Le gel est utilisé 24 heures plus tard.

Le gel polymérisé est placé une heure sous une tension de 200 volts (14 mA). Des échantillons de 4 μl sont alors déposés sur de petites bandes de papier Whatman au milieu du gel. Les ampholytes utilisés ici ont une résolution comprise entre pH 3 et pH 10 ou entre pH 4 et pH 6 (Pharmacia fine Chemical, Piscataway, N.J.). A l'anode est appliquée une solution d'acide aspartique 0,04 M. A la cathode est appliquée une solution de NaOH 1M.

La migration se fait alors pendant 2 heures à environ 4°C sous une tension de 550 volts (8,6 mA). La révélation est effectuée en présence de bleu de tétrazolium et riboflavine comme décrit plus haut (Beauchamp et Fridovich 1971).

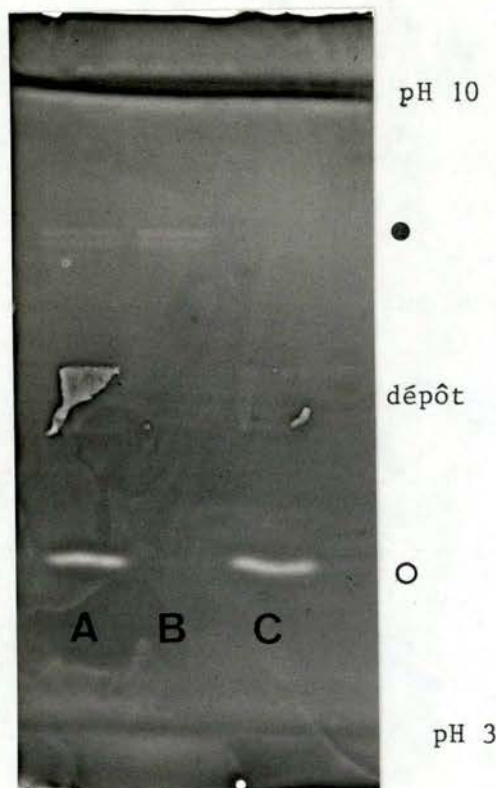
La figure 22 présente l'image d'une électrofocalisation (pH 3-10) réalisée sur un surnageant de cellule jeune g29-g30 (a) sur une fraction mitochondriale (b) sur la SOD-Cu Zn cytoplasmique (c).

La figure 23 présente les résultats obtenus par électrofocalisation (pH 3-10) d'une fraction de matrice "soniquée" (1) et d'une fraction "espace inter-membranaire" (2) obtenues à partir d'une fraction ML. de cellules WI-38 jeunes g29-g30.

La figure 24 illustre l'image d'une électrofocalisation (pH 4-6) réalisée à partir d'une "fraction cytoplasmique" de cellules WI 38 g29-g30 (A,D) et g51-g52 (B,C).

figure 22

Electrofocalisation entre pH 3 et pH 10

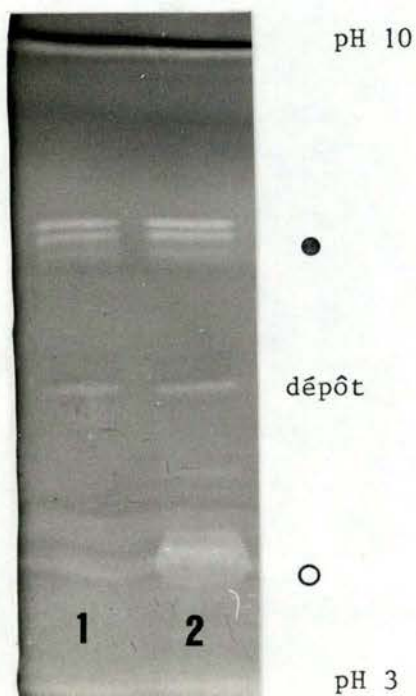


- A surnageant g29-g30
- B fraction mitochondriale
- C activité SOD-Cu Zn cytoplasmique
- isoenzymes mitochondriales (pH 8-pH 9)
- enzyme cytoplasmique (pH 5-pH 6)

figure 23

Electrofocalisation entre pH 3 et pH 10 d'une fraction "matrices soniquées"(1) et d'une fraction "espace inter-membranaire"(2) de cellules WI-38 jeunes g29-g30.

- isoenzymes mitochondriales (pH 8-pH 9)
- activité inter-membranaire (pH 5-pH 6)



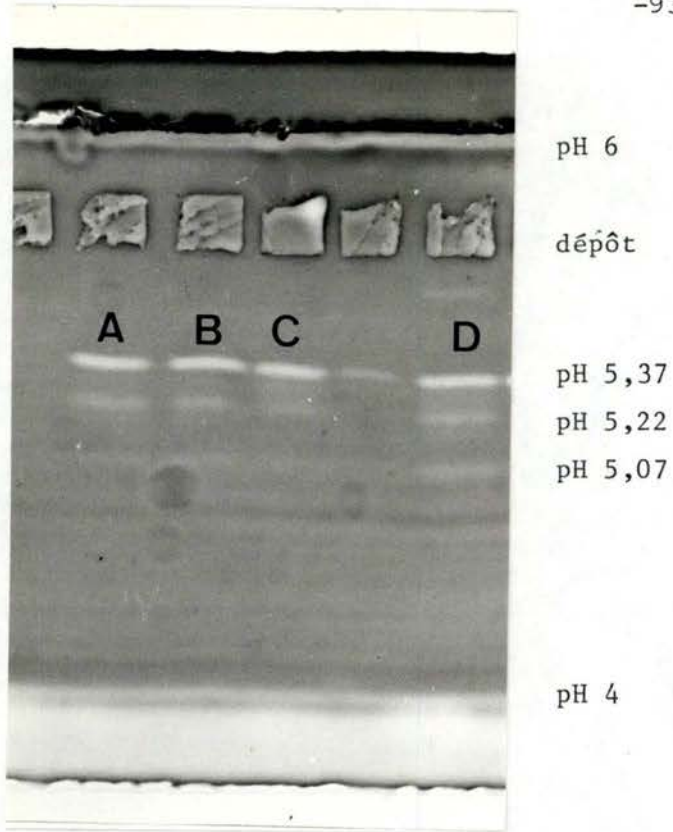


figure 24

Electrofocalisation entre pH 4 et pH 6, d'une "fraction cytoplasmique" de cellules W-I 38 g29-g30 (A et D) et g51-g52 (B et C).

e) Conclusions

1) Nous constatons que les isoenzymes de la SOD-Cu Zn cytoplasmique de cellules WI-38 sont anodiques et au moins au nombre de 3. Les points isoélectriques sont respectivement d'environ 5,37, 5,22 et 5,07 (figure 24). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Koster et al. (1980) et de valeurs un peu supérieures par rapport aux résultats de Lönnerdal et al. (1979) et Marklund et al. (1976). La sénescence des fibroblastes WI-38 ne provoque pas de modification des points isoélectriques des isoenzymes de la SOD cytoplasmique, ni un réarrangement quantitatif de ces isoenzymes (figure 24). Ces résultats concordent avec ceux décrits par Reiss et Gershon (1976 b).

2) La figure 23 illustre la double localisation de la SOD mitochondriale. La première : matricielle, présente trois isoenzymes cathodiques dont les points isoélectriques sont situés entre pH 8,0 et pH 9,0, (1). Il s'agit donc d'isoenzymes de la SOD-Mn.

La seconde : dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, présente une activité dismutasique anodique faible entre pH 5 et pH 6, comparable à la localisation de la SOD-Cu Zn cytoplasmique. Nous ne mettons pas en évidence d'isoenzymes de la SOD-Cu Zn inter-membranaire.

Enfin, nous constatons la contamination importante des isoenzymes matricielles mitochondriales dans la fraction "espace membranaire".

3) L'électrofocalisation entre pH 3 et pH 10 confirme les positions isoélectriques opposées des SOD cytoplasmiques (pH 5 - pH 6) et mitochondriales (pH 8,0 - pH 9,0). (figure 22).

Nous constatons la présence d'un léger contaminant mitochondrial dans le surnageant de cellules g29-g30 (a) qui n'était pas détectable par la simple électrophorèse décrite à la figure 21 - (6).

4) La compartimentation des SOD de fibroblastes se caractérise donc par 3 isoenzymes anodiques cytoplasmiques - SOD-Cu Zn
3 isoenzymes cathodiques mitochondriales (Matrices)- SOD-Mn
une (?) activité dismutasique anodique mitochondriale (espace inter-membranaire) - SOD-Cu Zn.

Enfin, la sénescence ne modifie pas la mobilité électrophorétique de ces enzymes ni les points isoélectriques des isoenzymes cytoplasmiques (figure 21 et 24).

La figure 41 montrera que cela est vrai également pour les points isoélectriques des isoenzymes mitochondriales de cellules âgées (g51-g52).

3.4.6 Activités des Superoxyde dismutases présente chez les cellules WI-38 jeunes et vieilles

Des lots de cellules à différents âges de la culture ont été testés. Les résultats des activités SOD cytoplasmiques (S) et SOD mitochondriales (M) sont exprimés en U. par mg protéines et par millions de cellules. Les protéines sont quantifiées par la méthode de Lowry et al. (1951).

Exprimées par mg de protéines, les activités dismutasiques cytoplasmiques et mitochondriales semblent ne pas évoluer de manière significative au cours du vieillissement cellulaire. Exprimées par cellule, ces activités indiquent une nette croissance intracellulaire. Cependant, nous n'avons aucun renseignement sur l'efficacité réelle des SOD à pH 7,4, dans les cellules. De plus, ces

observations ne nous renseignent pas sur la qualité intrinsèque de ces protéines. Tout au plus, pouvons-nous considérer que dans les contraintes de notre dosage (tampon SET, pH 9,0 à 25°C), les quantités de SOD par cellule augmentent significativement en fonction de l'âge et suggèrent qu'il s'agirait d'une réponse de défense cellulaire face à la production augmentée de radicaux libres au cours de la sénescence.

Cellules WI-38	Protéines totales (mg)	Activité SOD			U. SOD (S) / mg prot.
		U. /mg	%	U. /10 ⁶ cellules	U. SOD (M) / mg prot.
g29-g30 (S)	14,20	1,44	53,93	0,36	1,17
(M)	17,38	1,23	46,07	0,31	
g35-g36 (S)	12,26	1,56	55,52	0,46	1,25
(M)	15,42	1,25	44,48	0,37	
g52-g53 (S)	11,34	1,52	55,68	1,27	1,26
(M)	14,89	1,21	44,32	1,01	

3.4.7 Fractionnement des cellules par centrifugation différentielle

Le fractionnement a été réalisé suivant la méthode décrite par Remacle et al. (1980). Lavées trois fois avec un tampon phosphate pH 7,4 - NaCl 0,9 % puis avec une solution 0,25 M sucrose - 1 mM EDTA, pH 7,4; les cellules sont détachées des parois du verre pour être centrifugées 10 minutes à 220 g.

Le culot est resuspendu avec 2,5 ml de sucrose 0,25 M tamponné avec du Tris-HCl 25 mM à pH 7,4. Les cellules resuspendues sont homogénéisées 20 fois dans un homogénéiseur Dounce avec un piston serré (Kontes Glass Co, Vineland, NY).

Le fractionnement par centrifugation différentielle est réalisé selon la méthode décrite par Amar-Costesec et al. (1974).

Les fractions nucléaire (N), mitochondriale (ML) et microsomiale sont obtenues après centrifugations différentielles successives utilisant le rotor Beckman n° 40 et des vitesses de rotation de 1.700, 25.000 et 40.000 rpm. L'intégrale du carré des vitesses angulaires ($W = \int_0^t W^2 dt$ (rad² s⁻¹)) était respectivement de $1,9 \cdot 10^7$; $2,5 \cdot 10^9$ et $3 \cdot 10^{10}$ (rad² s⁻¹).

Les fractions sont resuspendues, homogénéisées au Dounce et lavées une fois; les surnageants sont combinés pour l'obtention des fractions suivantes.

Les résultats du fractionnement calculés selon de Duve et al. (1955) sont présentés à la figure 25.

La cytochrome oxydase : enzyme marqueur des mitochondries est trouvée principalement dans la fraction ML. (de Duve et al. 1962).

La N-acétyl-β-glucosaminidase, spécifique des lysosomes (Dillard et Tappel 1974; Tulken et al. 1974) se retrouve dans cette même fraction.

La 5'nucléotidase et la phosphodiesterase alcaline I sont associées aux membranes plasmiques dans le foie de rat (Coleman et al. 1967; Emmelot et al. 1964). Dans les fibroblastes WI-38, ces deux enzymes marqueurs sont également localisées au niveau des membranes plasmiques et se retrouvent dans la fraction microsomiale (Raes et al. 1980). Associée à cette fraction, on retrouve la galactosyltransférase qui est un marqueur de l'appareil de Golgi (Morré et al. 1969; Fleisher et Fleisher 1970).

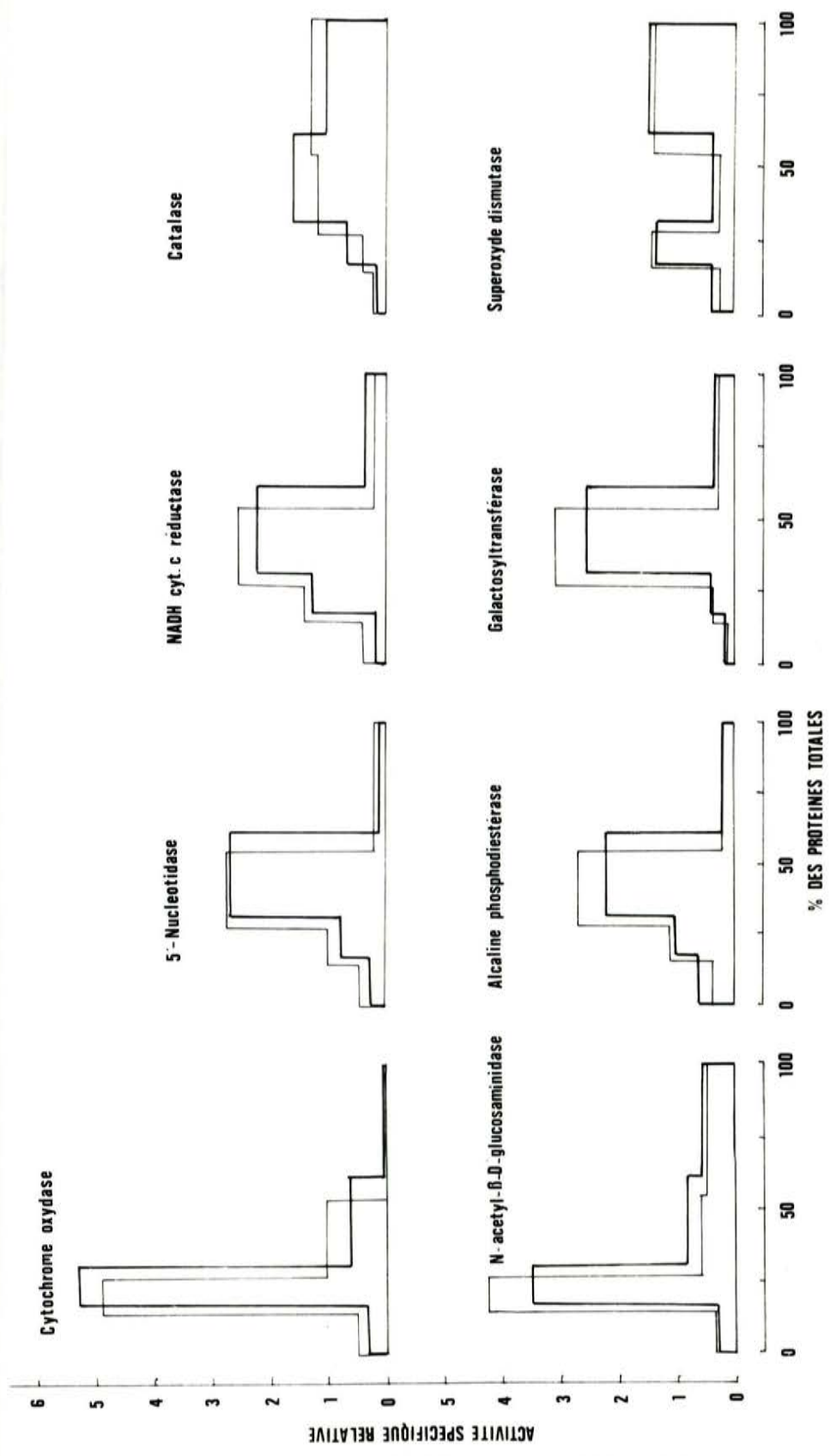


figure 25 : Distribution des enzymes après fractionnement par centrifugation différentielle de jeunes (trait fin) et de vieux (trait gras) fibroblastes WI-38. En abscisse est reporté le pourcentage en protéine de chaque fraction. (de gauche à droite : la fraction nucléaire, mitochondriale, microsomiale et soluble). En ordonnée est reportée l'activité spécifique relative des fractions. Les récupérations à partir de l'homogénat se situent entre 82 et 116 %.

La catalase, associée aux peroxysomes de foie de rat (Fowler et al. 1977) présente ici, une activité importante dans la fraction microsomialé. Au niveau de la fraction soluble, l'activité catalasique représente environ 35 à 45 % de l'activité enzymatique totale.

La NADH cytochrome C réductase non mitochondriale serait attribuable aux éléments dérivés du réticulum endoplasmique. On la retrouve dans la fraction microsomialé (Remacle et al. 1980).

Enfin, la superoxyde dismutase se retrouve, et dans la fraction mitochondriale, et dans la fraction soluble (Peeters-Joris et al. 1975). Globalement, la comparaison entre cellules jeunes et cellules vieilles par cette approche ne présente pas de différence significative.

3.5 Etude des modifications enzymatiques de la SOD liées au vieillissement des fibroblastes WI-38 en culture

Les modifications de la SOD ont été mises en évidence par deux approches très différentes.

3.5.1 Comportement thermosensible des SOD de fibroblastes WI-38

Holliday et Tarrant (1972) ont effectué des essais de thermostabilité enzymatique qui ont mis en évidence dans une même population enzymatique de cellules vieilles, la présence d'une sous-population enzymatique plus thermolabile que la forme normalement présente chez les jeunes cellules. C'est notamment le cas pour la Glucose-6-phosphate déshydrogénase, la 6-phosphogluconate déshydrogénase et l'hypoxanthine phosphorybosyl-transférase.

Dans la même optique, Houben et Remacle (1978) ont étendu cette analyse de thermolabilité à trois enzymes lysosomiales : la N-acétyl- β -glucosaminidase, l' α -D-glucosidase et la N-acétyl- α -D-galactosaminidase et une enzyme mitochondriale : la sulfite cytochrome C réductase. Leurs conclusions montrent qu'une sous-population enzymatique plus thermolabile ne peut être mise en évidence que dans le cas d'enzymes cytoplasmiques de cellules vieilles. Ils concluent que les autres enzymes présentent au cours du vieillissement, une grande homogénéité de comportement thermolabile probablement liée à leur compartimentation sub-cellulaire.

Dans ce contexte, et étant donné que nous avons à notre disposition une enzyme ayant une localisation multiple dans la cellule, nous allons répondre à deux questions concernant la SOD : Y a-t-il apparition d'une forme thermolabile chez les vieilles cellules, et si oui, cette modification s'observe-t-elle à la fois pour l'enzyme cytoplasmique et l'enzyme mitochondriale ?

a) Méthode

Chaque lot de cellules est homogénéisé, centrifugé et resuspendu dans le milieu SET pH 9. Le cytoplasme est incubé à 70°C et à des temps déterminés, des échantillons de 250 µl sont prélevés afin de déterminer l'activité enzymatique résiduelle. Le même schéma expérimental est appliqué pour la fraction mitochondriale après sonication (4 x 30 secondes). Les figures qui suivent donnent le bilan général des observations effectuées sur des fibroblastes WI-38 à des âges de culture différents (figure 26).

Les résultats sont présentés sur un graphique où l'axe des ordonnées représente le pourcentage d'inhibition de la formation d'adrénochrome (% I.F.A.) et l'axe des abscisses, le temps d'incubation en minutes des enzymes à 70°C.

b) Résultats

Les analyses de thermolabilité ont été réalisées sur des fibroblastes WI-38 de générations g29-g30 (figure 26 **A**), g38-g39 (figure 26 **B**) g47-g48 (figure 26 **C**) et g51-g52 (figure 26 **D**).

Pour chacune des figures, on retrouve :

en **a**), la thermorésistance de la SOD mitochondriale (SOD-Mn + SOD-Cu Zn inter-membranaire)

en **b**), la thermorésistance de la SOD cytoplasmique (SOD-Cu Zn).

Il apparaît clairement que seule l'enzyme SOD-Cu Zn cytoplasmique présente une hétérogénéité de comportement thermorésistant à pH 9 et à 70°C. Cette hétérogénéité n'apparaît qu'après la génération 40. En seconde analyse, sachant que l'évolution à haute température du comportement thermorésistant d'une protéine suit une décroissance exponentielle, nous devons émettre l'hypothèse qu'il existe au moins deux exponentielles décroissantes additionnées pour rendre compte de l'hétérogénéité du comportement

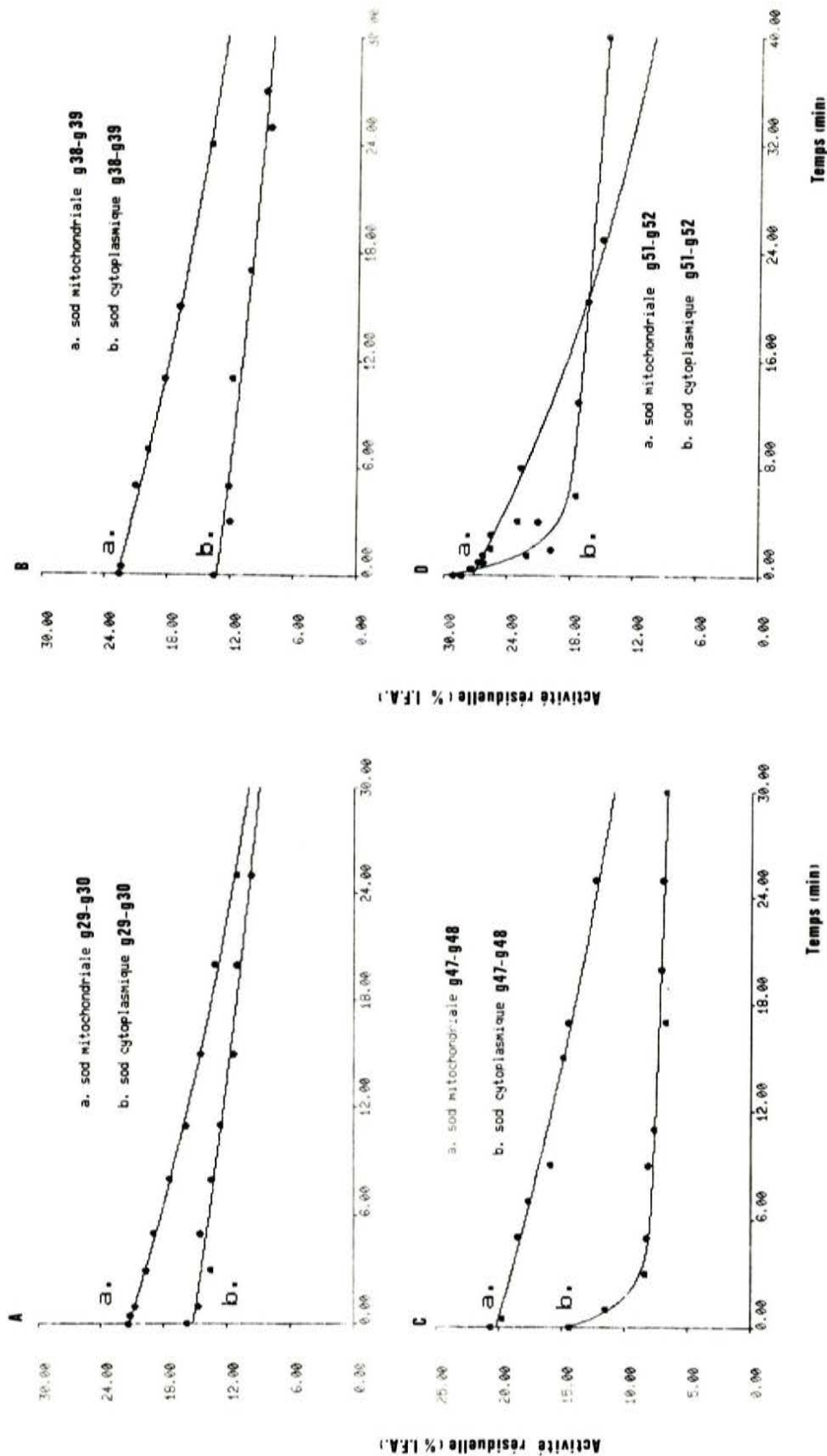


Figure 26 : courbes d'inactivation à 70°C dans un tampon S.E.T., pH 9, des superoxyde dismutases cytoplasmiques et mitochondriales de fibroblastes WI-38 à la génération g29-g30 (**A**), g38-g39 (**B**), g47-g48 (**C**), g51-g52 (**D**). L'activité des SOD est exprimée en % d'inhibition de la formation d'adrénochrome (% I.F.A.) en fonction du temps d'incubation. Les courbes d'activation des courbes d'activités cytoplasmiques des figures 26-C et 26-D. Dans ce cas, l'optimisation est réalisée par une fonction : somme de deux exponentielles.

thermorésistant de la SOD-Cu Zn cytoplasmique des cellules g47-g48 et g51-g52. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé le programme BMDP3R (Biomedical Computer Programs P-series 1979, Dpt. of Biomathematics, University of California, Los Angeles) (BMDP-79).

Ce programme estime les paramètres d'une fonction non linéaire par la méthode des moindres carrés en utilisant l'algorithme de Gauss-Newton (Jennrich et Sampson 1968). La fonction optimisée à partir des résultats présentés ci-dessus (figure 26) est du type :

$$y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}.$$

Le tableau 8 présente les résultats obtenus par ce programme sur les courbes de la figure 26.

Les SOD mitochondriales et les SOD cytoplasmiques (g29-g30 et g38-g39) présentent une homogénéité de comportement thermorésistant au cours du vieillissement. Les constantes de vitesse de dénaturation (b_1) ne sont pas significativement différentes. Par contre, les SOD cytoplasmiques (g47-g48 et g51-g52) présentent une bimodalité de comportement thermorésistant pour laquelle les constantes de vitesse de dénaturation b_1 et b_2 ne sont pas respectivement, significativement différentes.

Cependant, l'évolution de la constante de vitesse de dénaturation (b_1) des SOD-Cu Zn cytoplasmiques de la génération g29-g30 à la génération g51-g52 s'accroît au moins d'un facteur 4 entre cellules jeunes et cellules vieilles.

L'évolution de la constante de vitesse de dénaturation (b_1) des SOD-Mn mitochondriales varie peu en fonction de l'âge chronologique cellulaire.

Nous concluons donc à l'apparition au niveau de la SOD-Cu Zn cytoplasmique, d'une forme enzymatique modifiée plus thermosensible qui représente environ 43,73 % de la SOD-Cu Zn aux générations g47-g48, environ 38 % aux générations g51-g52 et environ 47,36 % aux générations g52-g53 (cfr. figure 45(b)).

$$y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$$

Activités dismutasiques fibroblastes WI-38	n*	valeurs des paramètres $\pm 2 \text{ s.}^\circ$ (% I.F.A.) [□]				CMR*
		a ₁	b ₁	a ₂	b ₂	
a) g29-g30	9	15,15 \pm 0,28	0,017 \pm 0,001	-	-	0,255
b) g38-g39	7	13,16 \pm 0,66	0,015 \pm 0,004	-	-	0,269
c) g47-g48	10	6,31 \pm 0,90	0,690 \pm 0,240	8,12 \pm 0,68	0,007 \pm 0,005	0,115
d) g51-g52	9	11,21 \pm 3,82	0,570 \pm 0,420	18,40 \pm 3,30	0,006 \pm 0,008	2,262
Mitochondries						
e) g29-g30	10	21,20 \pm 0,09	0,025 \pm 0,0005	-	-	0,038
f) g38-g39	7	22,61 \pm 0,26	0,019 \pm 0,001	-	-	0,048
g) g47-g48	8	20,17 \pm 0,54	0,020 \pm 0,002	-	-	0,209
h) g51-g52	9	27,18 \pm 0,72	0,024 \pm 0,004	-	-	0,689

Tableau 8 : ajustement de la fonction $y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$ pour les courbes de thermolabilités obtenues sur la SOD cytoplasmique et mitochondriale de jeunes et vieux fibroblastes WI-38.

* nombre de points expérimentaux

° 2 écart -types

• carré moyen résiduel

— non détectable

□ % d'inhibition de la formation d'adrénochrome

De plus, ces résultats suggèrent que la population SOD-Cu Zn est constituée de molécules normales et de molécules "altérées" d'activité enzymatique affaiblie. Ces dernières (plus sensibles à la température), exigeraient des quantités d'antisérum plus importantes par unité d'activité (Rothstein 1981).

Afin de résoudre ce dernier point, nous avons analysé par immunotitration, les SOD-Cu Zn cytoplasmiques de jeunes et vieilles cellules.

3.5.2 Comportement immunologique des SOD de fibroblastes WI-38

Cette deuxième approche consiste à déterminer pour un niveau fixé d'activité enzymatique, l'activité enzymatique retrouvée dans le précipité. Danot et Gershon (1975), Reiss et Rothstein (1975), Glass et Gershon (1981), Reiss et Gershon (1976 a, 1976 b) et Gershon et Gershon (1970, 1973, 1973 a) ont utilisé avec succès cette méthode pour étudier le comportement antigénique de l'aldolase, l'isocitrate lyase et la SOD cytoplasmique. Nous analyserons nos résultats en fonction de ceux obtenus sur la SOD cytoplasmique de foie de rats jeunes et vieux par Reiss et Gershon (1976 a; 1976 b).

a) Préparation d'antisérum anti-SOD

Les lapins reçoivent des injections répétées de SOD pure humaine (SOD-Cu Zn d'erythrocytes, Sigma) selon la méthode décrite par Chase (1967). Après centrifugation, le sérum anti-SOD est précipité au sulfate ammonique (50 % de saturation) pH 6,7 glacé. En effet, il faut noter que le sérum contient une activité SOD qui est ainsi éliminée. Le précipité au sulfate ammonique est repris dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,4 puis dialysé 24 heures contre du tampon phosphate 20 mM pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M (avec deux changements du liquide de dialyse).

b) Titration de la SOD pure par l'anti-sérum anti-SOD

Les lots de 0,6 U. de SOD pure (sigma) sont incubés une nuit à 4°C en présence de quantité croissante d'antisérum puis centrifugés 30 minutes à 3000 g, les activités résiduelles sont mesurées dans le surnageant (figure 27).

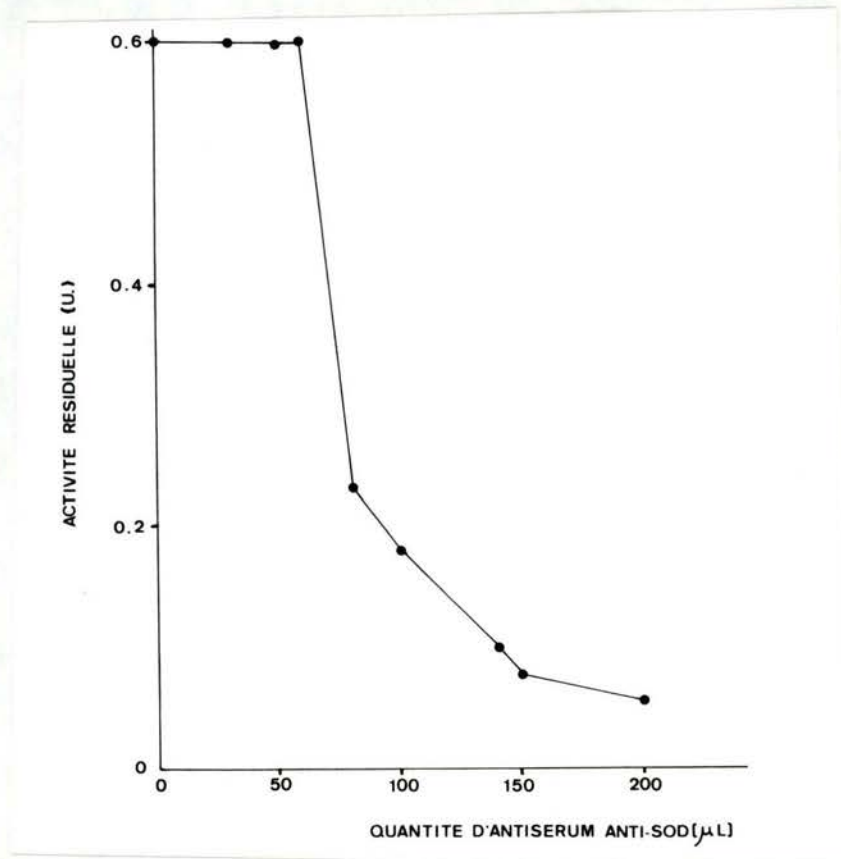


Figure 27 : titration de 0,6 U. de SOD-Cu Zn d'érythrocytes humains (sigma) par des quantités croissantes d'anti-sérum anti-SOD.

Le plateau d'activité SOD pour des quantités inférieures à 60 μ l d'anti-sérum anti-SOD, s'explique par l'excès d'antigène (SOD) par rapport aux anticorps (anti-SOD) qui forment ensemble, un complexe soluble antigène-anticorps. La décroissance d'activité soluble n'apparaissant que pour des quantités d'anticorps supérieures à 60 μ l.

c) Titration de la SOD-Cu Zn cytoplasmique jeune et vieille

Des surnageants contenant 0,6 U. de SOD-Cu Zn cytoplasmique jeune (cellules WI-38, g29-g30) et vieille (cellules WI-38, g51-g52) sont mélangées à 0,28 ml de tampon S.E.T. pH 9,0, en présence de quantités croissantes d'anti-sérum anti-SOD. Dans les tests contrôles, l'anti-sérum est remplacé par du sérum normal (figure 28).

On constate un plateau d'activité SOD jusqu'à environ 50 μ l d'anticorps pour la SOD jeune. Ceci semble répondre au même phénomène décrit à la figure 27 avec cependant une décroissance plus lente pour l'activité cytoplasmique au delà des 50 μ l d'anti-SOD.

Par contre, le plateau d'activité SOD-Cu Zn des fibroblastes WI-38 g51-g52, se maintient jusqu'à environ 140 μ l d'anticorps. La décroissance d'activité résiduelle qui se dessine ensuite évolue parallèlement à celle de la SOD jeune.

L'activité résiduelle jeune ou vieille en présence de sérum normal indique indirectement, la spécificité qui existe entre antigène (SOD cytoplasmique) et anticorps (anti-SOD).

Nous constatons donc qu'il y a identité immunologique entre les deux populations enzymatiques jeunes et vieilles. Cependant, une quantité double d'antisérum (par rapport à la quantité utile pour amorcer la décroissance d'activité résiduelle jeune) est requise pour voir apparaître la même décroissance de l'activité résiduelle vieille. Ceci indique donc la présence d'un matériel à réaction croisée (CRM) dans la population dismutasique vieille (Reiss et Gershon 1976 a; 1976 b).

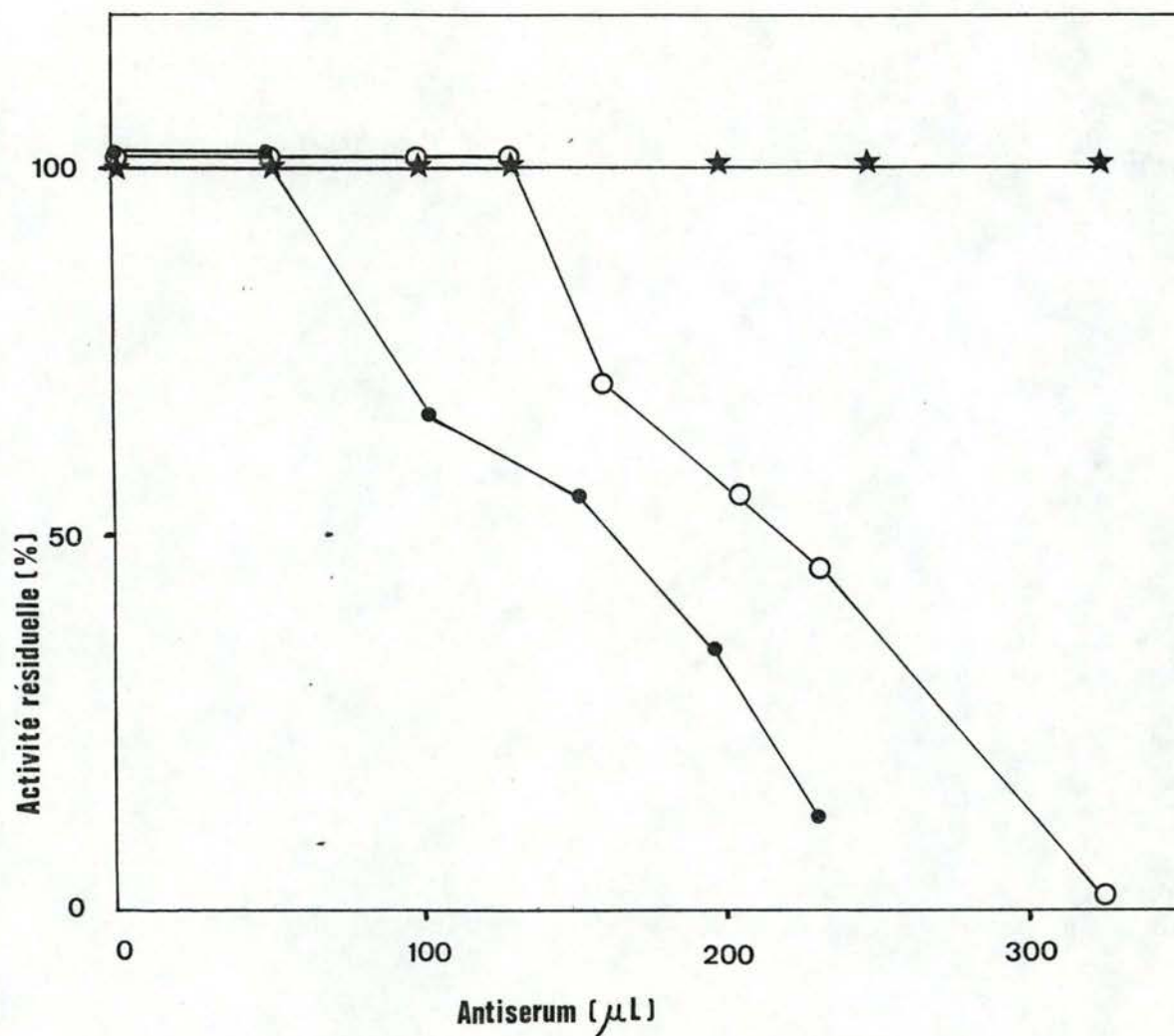


Figure 28 : titration de 0,6 U. de SOD-Cu Zn cytoplasmique jeune (g29-g30;●-●) et vieille (g51-g52;○-○) par des quantités croissantes d'anti-sérum anti-SOD.
★ expérience réalisée en présence de sérum normal.

De plus, les quantités d'anti-sérums requises pour précipiter 50 % de l'activité SOD-Cu Zn initiale sont respectivement de l'ordre de 150 et 220 μ l pour la SOD-Cu Zn d'origine cellulaire g29-g30 et g51-g52. Le rapport de ces 2 quantités (220/150) est comparable à celui obtenu par Reiss et Gershon (1976 b) sur la SOD-Cu Zn purifiée de foie de rat (170/120).

Nos résultats suggèrent que, pour une même quantité d'activité enzymatique SOD-Cu Zn, le nombre de molécules jeunes est inférieur au nombre de molécules vieilles dont la population globale présente une bimodalité de comportement thermolabile. Il est possible que "l'excès" de molécules vieilles moins actives s'exprime par immunotitration, par un retard de précipitation de l'activité dismutasique initiale.

3.6 Facteurs influençant la présence ou l'absence d'enzyme modifiée

Le point de départ de ce travail a été l'observation suivante : après incubation à 4°C pendant 2 heures d'un surnageant de cellules WI-38 g29-g30 (contenant 1 U. SOD-Cu Zn) avec un surnageant de cellules WI-38 g51-g52 (contenant 2,5 U. SOD-Cu Zn), l'analyse de la thermolabilité de la SOD ne présentait qu'une seule exponentielle décroissante d'équation :

$$y(t) = a_1 e^{-b_1 t}$$

pour laquelle $a_1 = 30,85 \pm 1,06$ (% I.F.A. ± 2 s°.)

$b_1 = 0,019 \pm 0,002$ (" ")

CMR[●] = 0,830

points expérimentaux : 6.

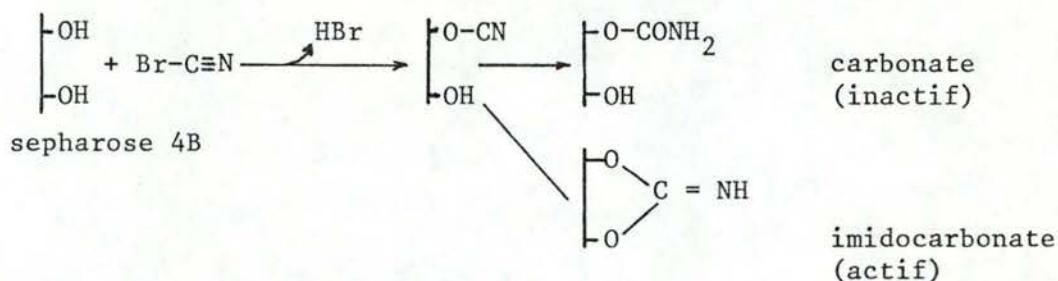
- carré moyen résiduel
- 2 écart-types

Cette équation présente une allure identique à celle obtenue sur la SOD-Cu Zn cytoplasmique g29-g30. La question se posait donc de savoir ce qu'était devenue la sous-population Cu-Zn cytoplasmique thermolabile présente au départ chez les vieilles cellules et comment cette "disparition" s'était réalisée. Disposant d'antisérum anti-SOD, nous avons réalisé plusieurs expériences croisées entre jeunes et vieilles cellules en utilisant les techniques suivantes :

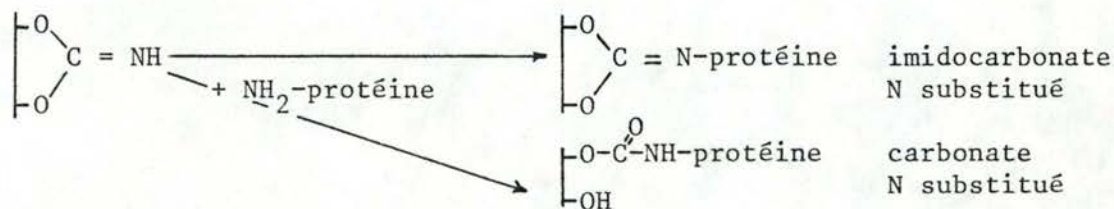
3.6.1 Purification des anticorps anti-SOD

Une méthode directe de purification d'anticorps consiste à fixer l'antigène sur un support insoluble, l'anticorps spécifique se lie à l'antigène et est seul retenu sur l'immunoabsorbant. Parmi les diverses méthodes d'insolubilisation des antigènes, nous avons retenu le couplage à un support d'agarose (sépharose 4B) après activation par le bromure de cyanogène (Cuatrecasas 1969; 1970; Remacle 1973). La réaction de couplage s'effectue en deux temps (Axén et Ernback 1971).

a) Activation du sépharose 4B par le BrCN



b) couplage de la protéine sur le dérivé imidocarbonate



Le sepharose 4B (pharmacia, Upsala, Sweden) (25 ml, 30 g) est lavé par une solution de NaHCO_3 0,2 M pH 9 et filtré; le gel est resuspendu dans une solution de NaHCO_3 50 mM à pH 11. Du BrCN, à raison de 0,81 g/g de sépharose est ajouté au gel sous agitation. Le pH est maintenu à 11 pendant 10 minutes par addition de NaOH 5N. L'excès de cyanure est éliminé par filtration sur Buckner et lavage par une solution de NaHCO_3 glacé (10 fois le volume du gel). Le gel activé est mis de suite en contact avec 20 mg de SOD-Cu Zn pure (sigma) et maintenu sous agitation à 4°C, lavé par du PBS, puis par une solution de lysine 0,2 M pH9.

Par cette technique, nous avons obtenu un rendement de couplage de 94 % soit 18,6 mg de SOD fixés.

c) Purification des anticorps anti-SOD

L'antisérum anti-SOD est placé sur la colonne (30 ml) (sépharose 4B-SOD) qui est alors lavée par du PBS jusqu'à l'obtention - dans le liquide de lavage, d'une densité optique à 280 nm inférieure à 0,02 unité.

Les anticorps anti-SOD sont alors décrochés de la colonne par un tampon glycine-HCl 0,2 M pH 2,8 et neutralisés à la sortie de la colonne par une solution Tris-HCl 0,5 M pH 8,0. L'éluat final est ajusté à pH 7,0 par du NaHCO_3 solide, concentré sur une membrane Amicon pM 30, dialysé contre du PBS pendant 2 jours et centrifugé à 20.000 rpm pendant 10 minutes dans une centrifugeuse Beckman J.A. -21. Nous avons recueilli 128 mg d'anticorps anti-SOD.

d) Couplage des anticorps anti-SOD sur sépharose 4B

Les anticorps purifiés sont couplés sur sépharose 4B par le BrCN. La méthode utilisée est celle décrite par Givol et al. (1970). Cette technique de couplage est semblable à celle utilisée

pour la SOD. Cependant, afin d'éviter une fixation excessive des IgG sur la colonne (qui les rendrait non fonctionnels), seulement 0,0125 g de BrCN (au lieu de 0,810g) sont utilisés pour activer 1 g de sépharose 4B. Le tableau 9 reprend les différentes étapes de ce couplage. Le rendement de ce couplage était de 97 % (soit 1 mg d'anti-SOD/ml gel final). La capacité de la colonne (sépharose 4B-anti-SOD) à fixer la SOD purifiée est déterminée selon le protocole repris au tableau 9. Le principe est simple, il consiste à incuber de la SOD en concentrations croissantes avec une quantité constante de gel (sépharose 4B-anti-SOD), à centrifuger le tout et déterminer l'activité dismutasique du surnageant. La figure 29 illustre les résultats de cette dernière expérience.

Nous constatons que le gel fixe l'enzyme; cependant, la capacité maximale de fixation est faible puisque 1 mg d'anti-SOD (1 ml sépharose 4B-anti-SOD) peut fixer 2,5 U. de SOD, soit 1,25 µg d'enzyme pure. Il faut donc constater que malgré l'utilisation de concentration faible en BrCN, celui-ci doit sans doute (encore) altérer la fonctionnalité des IgG couplés.

3.6.2 Impact comparé de l'environnement cytoplasmique jeune et vieux sur la forme SOD thermolabile

Dans un premier temps, nous avons utilisé les colonnes (sépharose 4B-anti-SOD) afin d'éliminer la SOD-Cu Zn des surnageants jeunes et vieux de fibroblastes WI-38. Ces surnageants épuisés en SOD sont alors incubés 2 heures à 4°C en présence d'autres surnageants jeunes ou vieux non privés de leur SOD-Cu Zn respective. L'analyse par thermorésistance à 70°C - tampon SET pH 9 est réalisée sur les solutions finales (tableau 10).

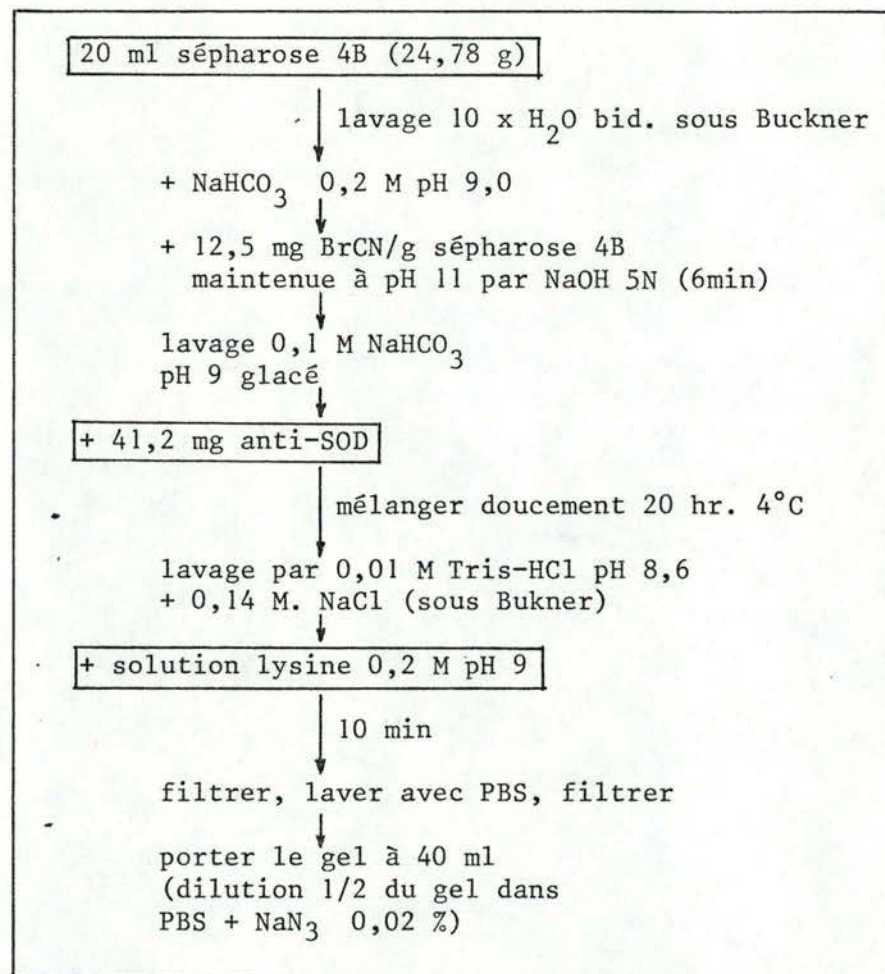


Tableau 9 : Schéma du couplage des IgG anti-SOD sur sépharose 4B activé par du BrCN (selon Givol et al. 1970).

pour chaque test



0,6 ml gel 1/2 (sépharose 4B-anti-SOD)
(contenant 0,6 mg d'anti-SOD)

- laver 3 x avec PBS
- centrifuger 2 min à 2.000 rpm (centrifugeuse de table)
- + concentrations croissantes en SOD dans chaque test
- compléter à 1 ml avec PBS
- incubé à 0°C pendant 30 min sous agitation
- centrifuger 2 min à 2.000 rpm. (centrifugeuse de table)
- doser l'activité dismutasique du surnageant

Tableau 9' : Protocole expérimental suivi pour déterminer la capacité du gel (sépharose 4B-anti-SOD) à fixer de la SOD-Cu Zn purifiée.

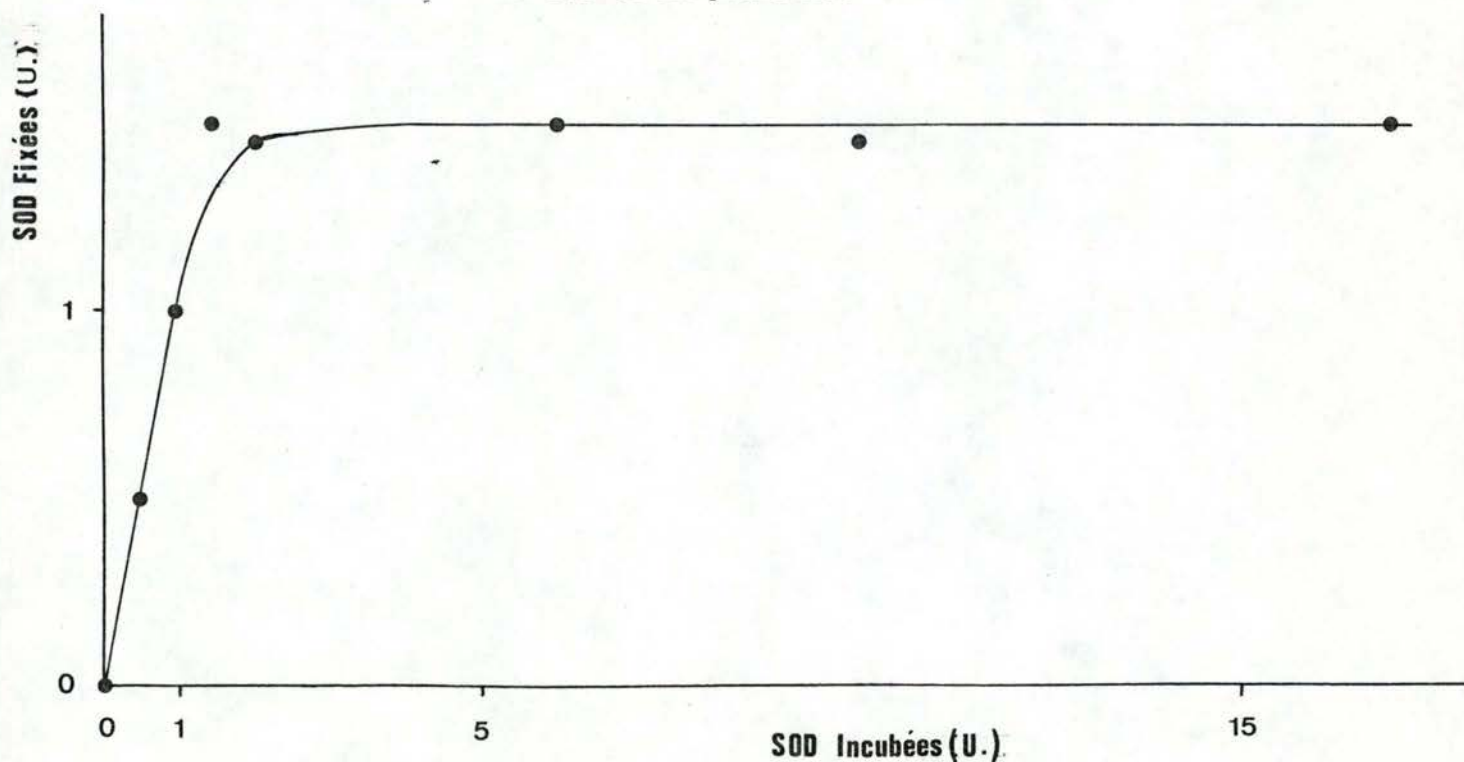


Figure 29 : courbe de fixation de la SOD purifiée (sigma) sur une colonne (sépharose 4B-anti-SOD (0,6 mg)). Les quantités de SOD fixées sont déterminées par différence entre quantités incubées et quantités retrouvées dans le surnageant (cfr. tableau 9').

L'enzyme SOD-Cu Zn d'origine âgée (g51-g52), entourée de son cytoplasme, mise en présence de cytoplasme épuisé jeune (g29-g30), voit sa population moléculaire plus thermolabile, non détectable (tableau 10-a). L'expérience inverse où la SOD-Cu Zn d'origine jeune (g29-g30), entourée de son cytoplasme, est mise en présence de cytoplasme épuisé vieux, n'entraîne aucune modification thermolabile (tableau 10-b). Les expériences contrôles sont illustrées en c et d tableau 10.

Il apparaît que le milieu cytoplasmique intervient pour modifier la SOD. Cette modification apparaît dans un sens particulier. Seul l'environnement cytoplasmique jeune rend la fraction thermolabile vieille non détectable. L'environnement vieux n'altère pas l'homogénéité du comportement thermolabile de l'enzyme dans son environnement jeune. Nous émettons l'hypothèse que

- 1) le milieu cytoplasmique influence le comportement thermolabile de la SOD.
- 2) cette influence serait déclenchée par la perte (ou l'acquisition) au cours du vieillissement d'un "facteur stabilisant" (ou "déstabilisant") la SOD-Cu Zn cytoplasmique.
- 3) le processus impliqué dans cette modification est réversible.

Afin de préciser davantage ce phénomène, nous avons choisi d'effectuer les mêmes expériences croisées mais cette fois, sur l'enzyme purifiée.

Les "fractions cytoplasmiques" g29-g30 et g51-g52 sont épuisées en SOD-Cu Zn après passage sur sépharose 4B-anti-SOD. Ensuite, elles sont incubées en présence de SOD-Cu Zn humaine purifiée (sigma) pendant 2 heures à 4°C et pH 9,0 (tableau 11). Les équations correspondantes aux courbes expérimentales (figures 30 - 31) sont présentées dans le tableau 11'.

fibroblastes WI-38	SOD-Cu Zn initiale (U.)	Passage sur (sépharose 4B- anti-SOD)	Activité SOD résiduelle (U.)	+ Surnageant complet (U. SOD)	Incubation 2 hr. 4°C. pH 9.	% SOD à thermolabilité accrue
(a) g29-g30	1,06	+	-	g51-g52 : 2,47		-
(b) g51-g52	0,99	+	-	g29-g30 : 2,66		-
(c) g51-g52	1,15	+	-	g51-g52 : 2,88		40
(d) g29-g30	1,06	+	-	g29-g30 : 2,66		-

Tableau 10 : présentation des résultats d'expériences croisées entre "fractions cytoplasmiques" jeunes (g29-g30) et vieilles (g51-g52). Les thermolabilités sont réalisées à pH 9 (tampon SET) et 70°C.

- non détectable.

Fibroblastes WI-38	SOD-Cu Zn initiale (U.)	Passage sur sépharose 4B- anti-SOD.	Activité SOD résiduelle (U.)	+ SOD pure (U.)	Incubation 2hr. 4°C-pH 9,0	% SOD à ther- molabilité accrue
(a) tampon SET pH 9,0 (con- trôle)	0		0	5,5	+	-
(b) g29-g30	6,40	+	-	4,1	+	-
(c) g51-g52	5,23	+	-	5,0	Δ	-
(d) g52-g52	5,23	+	-	6,5	+	40,55

Tableau 11 : Résultats d'incubations entre "fractions cytoplasmiques" jeune (g29-g30) ou vieilles (g51-g52) et SOD-Cu Zn humaine purifiée. Les thermolabilités sont réalisées à pH 9 (tampon SET) et 70°C.

Δ pas d'incubation

- non détectable

La SOD-Cu Zn (pure) ne présente de modification thermolabile qu'une fois incubée dans un environnement cytoplasmique vieux (g51-g52) (figure 31 - b). Environ 40,5 % de la population SOD totale se retrouve dans un état plus thermosensible sans pour autant voir son activité globale décroître. Ce point n'est pas en contradiction avec l'expérience croisée (b) présentée au tableau 10. En effet, on peut supposer que l'effet "environnement vieux" n'a pu se marquer sur la SOD cytoplasmique jeune; celle-ci étant protégée par son environnement propre. Il se confirme donc que le milieu interagit sur la SOD en modifiant au moins sa thermorésistance. D'autre part, nous provoquons artificiellement une modification dans le comportement thermorésistant de l'enzyme qui semble imiter le phénomène observé au cours du vieillissement (tableau 11'). 40 % de l'activité totale est plus thermosensible. Enfin, les constantes de vitesse de dénaturation ne sont pas significativement différentes entre-elles, à l'exception du paramètre b_1 (d) représentant la constante de vitesse de dénaturation de la part d'enzyme pure rendue plus thermolabile par l'incubation dans un environnement cellulaire vieux (tableau 11' - d).

Ces observations sont en accord avec celles obtenues par Kahn et al. (1977 b) sur la modification de la thermolabilité de la G6PD purifiée de leukocytes incubée dans un environnement cytoplasmique vieux. Ces auteurs concluent que la décroissance de résistance à la chaleur pour une enzyme vieille n'est pas due à l'altération de la molécule elle-même, mais bien plus, à l'altération du milieu cellulaire (Dreyfus et al. 1978).

Figure 30

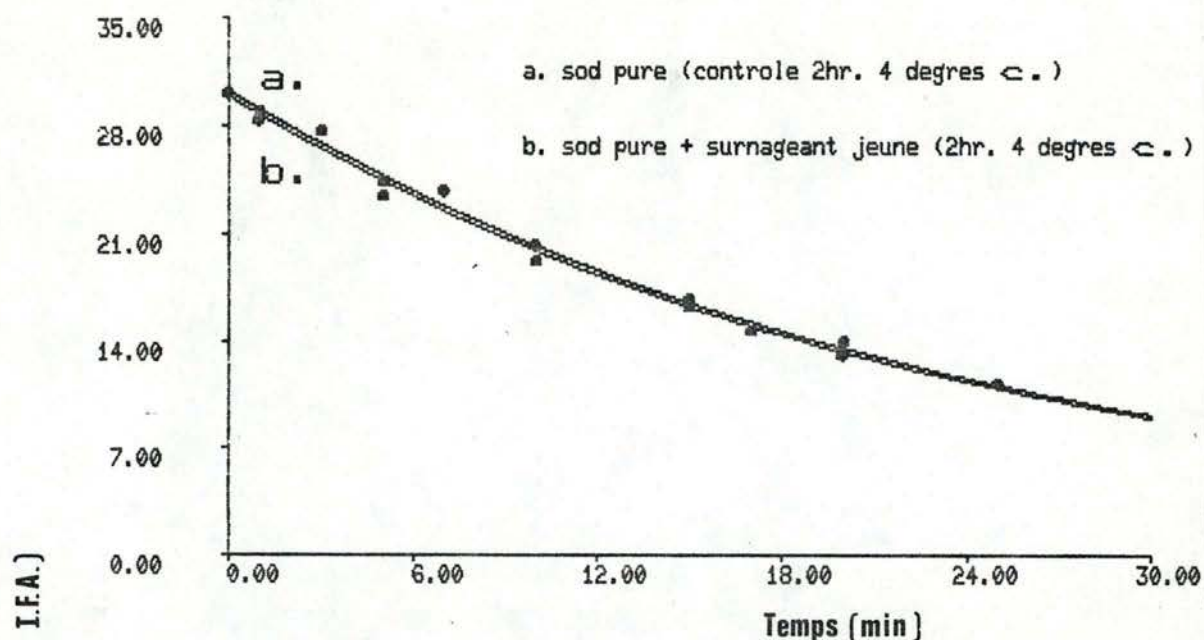


Figure 31

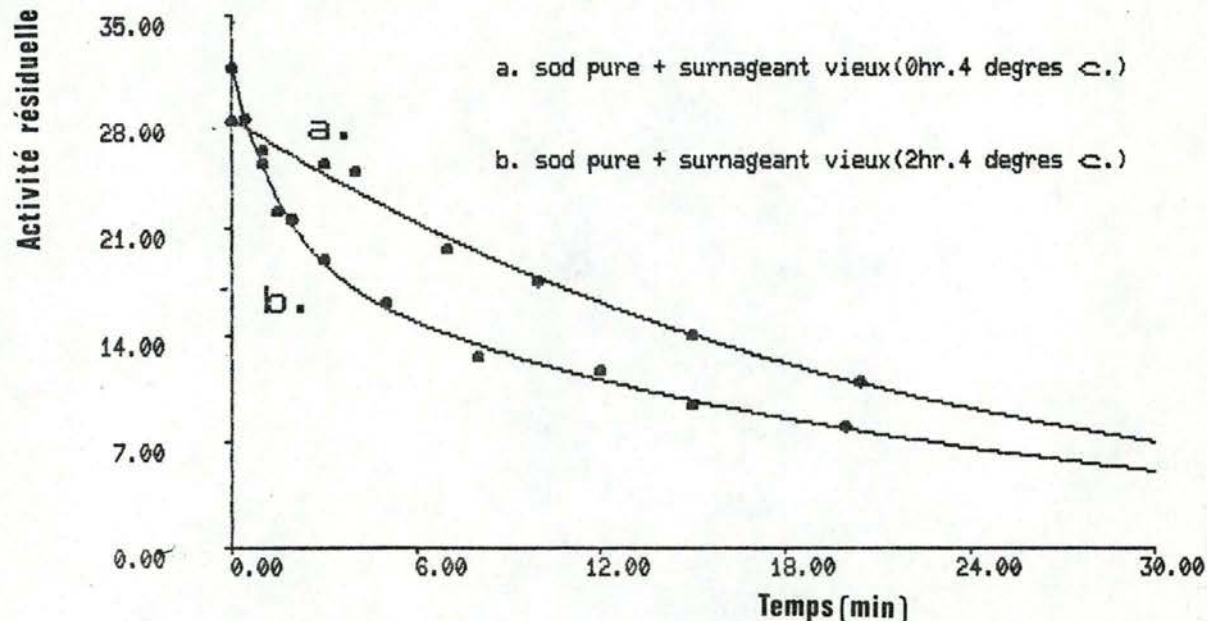


Figure 30 - 31 : courbes de thermoinactivation, à 70°C et pH 9,0, de la SOD-Cu Zn humaine (sigma) incubée dans un tampon SET (figure 30 a); dans un surnageant jeune (g29-g30) (figure 30 b); dans un surnageant vieux (g51-g52) au temps zéro (figure 31 a) et après 2 heures. L'activité de la SOD est exprimée en % de l'inhibition de la formation d'adrénochrome (% I.F.A.) en fonction du temps d'incubation. Les courbes sont optimisées par une seule fonction exponentielle à l'exception de la courbe b (figure 31). Dans ce cas, l'optimisation est réalisée par une fonction : somme de deux exponentielles.

$$y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$$

Activités dismutasiques SOD-Cu Zn pure	n*	valeurs des paramètres $\pm 2 s$: (% I.F.A.) ^a				CMR ^c
		a ₁	b ₁	a ₂	b ₂	
(a) tampon SET pH 9, 2 Hr., 4°C.	9	30,23 \pm 0,82	0,041 \pm 0,004	-	-	0,475
Cytoplasmes épuisés + SOD pure						
(b) g29-g30 - 2 Hr, 4°C	7	28,87 \pm 0,82	0,040 \pm 0,004	-	-	0,457
(c) g51-g52 - 0 Hr, 4°C	8	28,15 \pm 0,94	0,046 \pm 0,005	-	-	0,578
(d) g51-g52 - 2 Hr, 4°C	11	12,78 \pm 2,38	0,580 \pm 0,180	18,74 \pm 2,42	0,043 \pm 0,01	0,266

Tableau 11': Ajustement de la fonction $(y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t})$ pour les courbes de thermolabilité (70°C, pH 9) obtenues sur la SOD-Cu Zn pure : a) contrôle; b) dans un environnement cytoplasmique jeune (g29-g30) épuisé en SOD; dans un environnement cytoplasmique vieux (g51-g52) épuisé en SOD, au temps zéro (c) et après 2 heures d'incubation (d).

- * nombre de points expérimentaux
- ^a % d'inhibition de la formation d'adrénochrome
- ^b 2 écart-types
- ^c carré moyen résiduel
- non détectable

3.7 Caractéristiques de l'enzyme modifiée

Dans ce chapitre, nous allons montrer comment il est possible de décrire par différentes techniques, les caractéristiques de l'enzyme modifiée, soit artificiellement, soit "in vivo" au cours de la sénescence des fibroblastes WI-38 en culture.

a) Technique de chromatographie sur sephadex G 75

La chromatographie sur gel permet d'estimer le poids moléculaire d'une protéine. Le coefficient de partage (K_{av}) de celle-ci étant dans une certaine zone directement proportionnel au logarithme de son poids moléculaire. Ce coefficient est déterminé par la formule :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

où V_e représente le volume d'élution de la protéine, V_0 est le volume d'élution d'une substance exclue du gel et V_t , le volume total de la colonne.

Afin d'essayer de caractériser et d'isoler les deux sous-populations SOD-Cu Zn différentes par leur thermolabilité, nous avons utilisé une colonne de séphadex G 75 (0,5 x 79 cm) équilibrée à 4°C par un tampon SET pH 9, (débit : 4 ml/heure). La courbe d'étalonnage est présentée à la figure 32.

3.7.1 Caractéristiques de la SOD-Cu Zn (pure) modifiée artificiellement

La SOD-Cu Zn humaine (purifiée) est préalablement incubée 2 heures à 4°C, en présence de surnageants jeunes (g29-g30) épuisés en SOD endogène par passage sur une colonne (sépharose 4B-anti-SOD). Après incubation, les solutions sont déposées sur la colonne de séphadex G 75 (0,5 x 79 cm) et chromatographiées dans les conditions décrites ci-dessous.

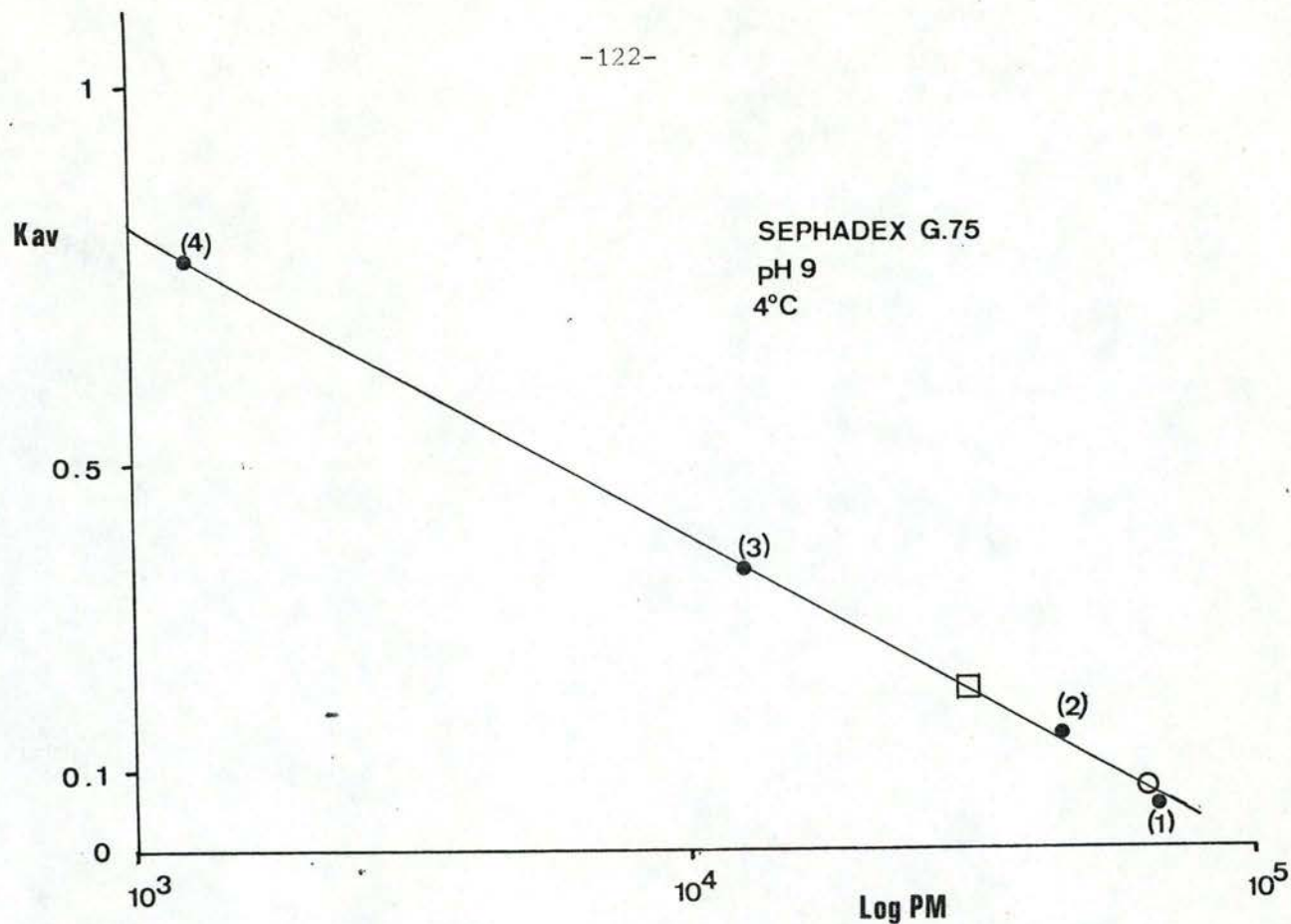


Figure 32 : courbe d'étalonnage d'une colonne sephadex G 75 (0,5 x 79 cm) équilibrée à 4°C par un tampon SET pH 9 et réalisée avec un débit de 4 ml/heure. Les molécules d'étalonnage sont :

- le bleu dextran 2000 ($V_o = 22,8$ ml; $V_t = 62,05$ ml)
- (1) - la sérum albumine bovine (PM 67.000, Kav = 0,06)
- (2) - l'ovalbumine (PM 45.000, Kav = 0,15)
- (3) - la cytochrome c (PM 12.800, Kav = 0,37)
- (4) - la cytochrome b₁₂ (PM 1.300, Kav = 0,79)
- SOD-Cu Zn humaine (PM 32.000, Kav = 0,21)
- SOD-Cu Zn humaine modifiée (PM 64.000, Kav = 0,08)

De plus, chaque pic d'activité dismutasique est thermolabilisé à 70°C dans un tampon SET pH 9 (figure 33).

Comme attendu, la distribution de la SOD-Cu Zn est unimodale (figure 33-A) et son poids moléculaire se localise à environ 32.000 daltons (figure 32-■), (Fridovich 1975; Mc Cord 1979 a, 1979 b; Hassan et Fridovich 1980). Incubée dans un environnement cytoplasmique jeune (g29-g30) épuisé en SOD, la SODCu Zn se distribue également de manière unimodale avec un poids moléculaire de 32.000 (figure 33-B). Par contre, la distribution de la SOD-Cu Zn incubée dans un environnement cytoplasmique vieux (g51-g52) présente une bimodalité (figure 33-C) avec un premier pic d'activité correspondant à une protéine de poids moléculaire 64.000 (figure 32-○) et un second pic plus important (70 % de l'activité totale) correspondant à l'enzyme de départ dont le PM vaut 32.000 daltons ($K_{av} = 0,21$) (figure 33-C).

Les protéines correspondant à ces pics d'activité ont été isolées et les courbes de thermolabilité réalisées sur chacune d'elles (figure 33-A', B', C'). Les paramètres des équations correspondantes aux courbes expérimentales sont présentées dans le tableau 12.

La SOD pure (32.000 daltons) présente une courbe de thermolabilité dont la constante de vitesse de dénaturation (b_1) n'est pas significativement différente de celle obtenue après incubation de l'enzyme dans la "fraction cytoplasmique" g29-g30. Avant passage sur séphadex G 75, l'incubation d'une "fraction cytoplasmique" g51-g52 avec la SOD pure provoque l'apparition d'une sous-population plus thermolabile ($b_1 = 0,69 \pm 0,20$) qui représente environ 35 % de la population SOD-Cu Zn totale (figure 34-a). La constante de vitesse de dénaturation des 65 % restant ($b_2 = 0,023 \pm 0,005$) n'est pas significativement différente du paramètre b_1 de la thermolabilité contrôle.

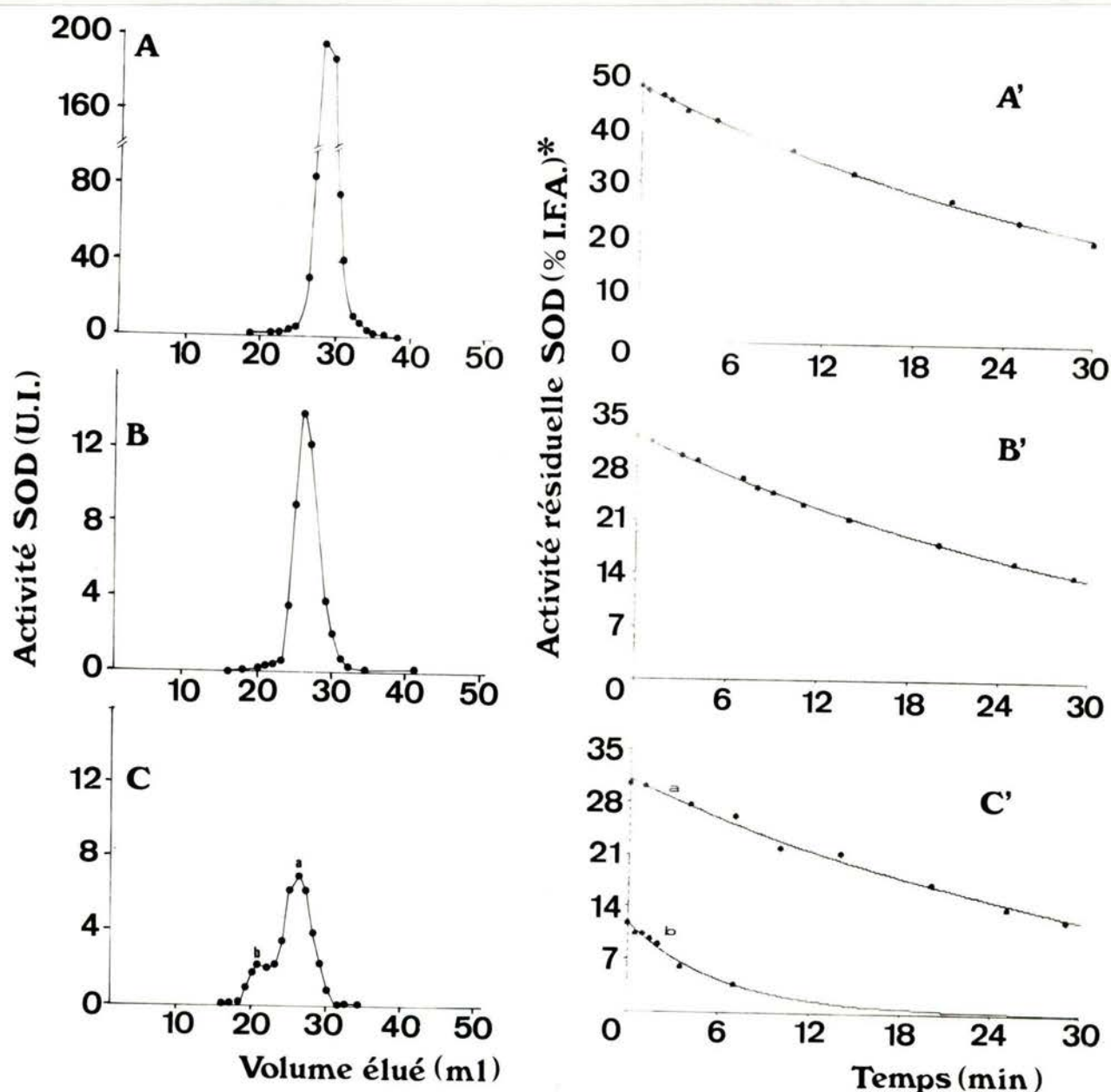


Figure 33 : courbes d'élution et de thermolabilité (70°C - tampon SET pH 9) de l'activité SOD-Cu Zn après passage sur sephadex G 75 (4°C - tampon SET pH 9 - débit 4 ml/H.).

- A contrôle SOD-Cu Zn (PM 32.000)
- A' thermoinactivation de la SOD-Cu Zn (PM 32.000)
- B SOD-Cu Zn (PM 32.000) + "fraction cytoplasmique" g29-g30 épuisée en SOD endogène
- B' thermoinactivation de l'incubation B
- C SOD-Cu Zn (PM 32.000) + "fraction cytoplasmique" g51-g52 épuisée en SOD endogène
- C' thermoinactivation des deux pics d'activités dismutasiques résultats de l'incubation C.
 - a) thermolabilité sur le pic 32.000 daltons
 - b) thermolabilité sur le pic 64.000 daltons

* % d'inhibition de la formation d'adrénochrome.

Après chromatographie sur sephadex G 75, nous isolons d'une manière plus ou moins complète deux sous-populations SOD-Cu Zn, l'une de poids moléculaire 64.000, l'autre de poids moléculaire 32.000. Les thermoinactivations effectuées sur ces deux populations présentent des constantes de vitesse de dénaturation significativement différentes - la première (PM 64.000) présente une constante b_1 égale à $0,16 \pm 0,03$, la deuxième (PM 32.000) une constante b_1 égale à $0,03 \pm 0,002$. Cette dernière est conforme à la constante b_1 du contrôle ($0,029 \pm 0,0008$).

La constante b_1 du pic d'activité dismutasique (64.000 daltons) est plus faible qu'attendu. Ceci n'est sans doute pas étranger à l'élution de cette fraction qui est trop proche du pic d'élution de l'activité dismutasique (32.000 daltons) et donc contamine la première sans pour autant être détectable dans l'ajustement de la fonction (somme de deux exponentielles). Les paramètres a_1, b_1 et b_2 estimés à partir de l'addition du pic d'activité (64.000 daltons) au pic d'activité (32.000 daltons) (figure 34-b) dans un rapport respectif 35 % + 65 % ne sont pas significativement différents des mêmes paramètres estimés sur l'incubation de SOD-Cu Zn dans une "fraction cytoplasmique" g51-g52 avant passage sur sephadex G 75 (figure 34-a). Seuls les paramètres a_2 (± 2 s.) sont à la limite du seuil d'une différence significative; les rapports estimés des deux sous-populations étant respectivement de 39,17 et 60,83 %. Enfin, aucune comparaison ne peut être réalisée entre les paramètres présentés au tableau 11 et ceux présentés au tableau 12, les conditions expérimentales conduisant aux thermolabilisations finales étant différentes.

Cependant, nous pouvons donc conclure que l'apparition artificielle d'une sous-population SOD-Cu Zn plus thermolabile n'est pas un artéfact; elle est liée à un environnement cytoplasmique particulier et présente une modification conformationnelle de la forme SOD-Cu Zn native dimérique (32.000 daltons) vers une forme SOD-Cu Zn modifiée "tétramérique" (64.000 daltons).

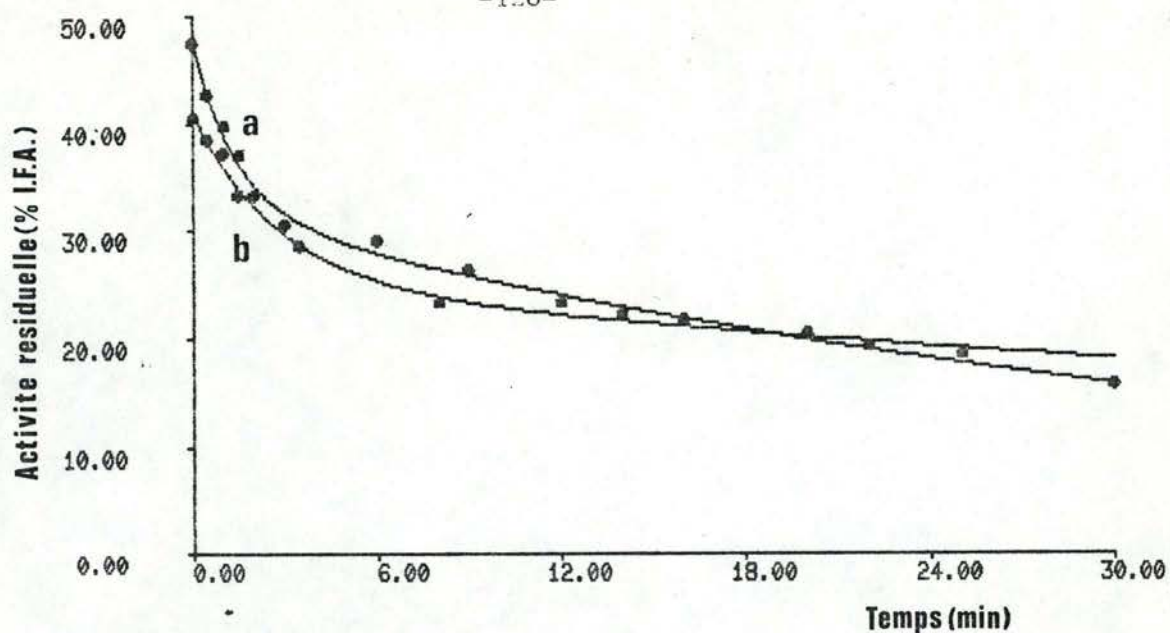


Figure 34 : Courbes de thermoinactivations (70°C, tampon SET pH 9) de SOD-Cu Zn incubée en présence d'une "fraction cytoplasmique" de fibroblastes WI-38 g51-g52 (2hr. 4°C - pH 9). Avant chromatographie sur sephadex G 75 (courbe a). La courbe b illustre le comportement thermorésistant du mélange de deux sous-populations dismutasiques. Après chromatographie sur sephadex G 75 le mélange est effectué dans le rapport 35% + 65 % (enzyme plus thermolabile + enzyme normale). Les activités résiduelles sont exprimées en % d'inhibition de la formation d'adrénochrome (% I.F.A.) en fonction du temps d'incubation (min).

$$y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$$

Activité SOD-Cu Zn pure	n*	valeurs des paramètres $\pm 2 s^{\circ}$ (% I.F.A.) [□]				CMR*
		a ₁	b ₁	a ₂	b ₂	
(a) contrôle (fig. 33-a)	11	47,86 \pm 0,36	0,029 \pm 0,0008	-	-	0,163
+ cytoplasme épuisé						
(b) g29-g30 (fig. 33-b')	12	32,18 \pm 0,20	0,029 \pm 0,0006	-	-	0,0357
(c) g51-g52 Avant passage sur sephadex G 75 (fig. 34-a)	12	16,03 \pm 2,42	0,690 \pm 0,2000	31,58 \pm 2,14	0,023 \pm 0,005	0,731
(d) g51-g52 Après passage sur sephadex G 75 (fig. 33-c')	7	11,70 \pm 0,48	0,16 \pm 0,030	-	-	0,203
pic 64.000 (b)	9	31,02 \pm 0,88	0,03 \pm 0,002	-	-	0,545
pic 32.000 (a)	9	16,04 \pm 3,96	0,36 \pm 0,160	24,91 \pm 4,12	0,01 \pm 0,008	0,725
(e) pic 64.000 + pic 32.000 (fig. 34-b)						

Tableau 12 : Ajustement de la fonction $y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$ pour les courbes de thermolabilités (70°C, pH 9) obtenues sur la SOD-Cu Zn pure : (a) contrôle; (b) dans un environnement cytoplasmique jeune (g29-g30) épuisé en SOD; dans un environnement cytoplasmique vieux (g51-g52) épuisé en SOD, avant (c) et après (d) passage sur sephadex G 75; (e) après mélange des formes "tétramérique" et "dimérique" dans un rapport de 35% et 65 %.

- * nombre de points expérimentaux
- % d'inhibition de la formation d'adrénochrome
- ° 2 écart -types
- carré moyen résiduel
- non détectable

b) Electrophorèse sur gel d'agarose

Des conclusions tirées ci-dessus, nous devons émettre l'hypothèse qu'il existe, dans le cas de la SOD-Cu Zn pure incubée avec du surnageant vieux (g51-g52), un mécanisme actif à 4°C qui provoque un phénomène de "polymérisation" de la forme native dimérique (PM 32.000) en une forme plus thermolabile "tétramérique" (PM 64.000). A cette étape de notre travail, nous avons voulu caractériser davantage cette forme "tétramérique" de la SOD-Cu Zn en utilisant les techniques d'électrophorèse sur gel d'agarose à pH fixé. Ainsi, on observera des migrations qui seront essentiellement fonction de la charge de la molécule en fonction du pH choisi.

Nous avons réalisé les électrophorèses sur Indubiose A₃₇ (Agarose - IBF 1,5 %). Les unes à pH 7,0 dans un tampon 50 mM Na-phosphate (figure 35), les autres à pH 8,6 dans un tampon véronal 50 mM. (figure 36). La révélation enzymatique est celle décrite par Beauchamp et Fridovich (1971) (cfr alinéa 3.4.5).

Les formes enzymatiques à thermolabilité normale migrent vers l'anode (+) tandis que la forme plus thermolabile migre plus lentement. Il semblerait donc que nous soyons en présence de molécules modifiées par le surnageant vieux (g52-g53) qui auraient à la fois, une thermolabilité accentuée, un poids moléculaire double de l'enzyme native et enfin présentant une migration électrophorétique ralentie.

Ce dernier point est important dans la mesure où l'on voit que les différences de charge entre la population SOD-CuZn normale et la SOD-Cu Zn modifiée (visualisée par l'incrément de migration) restent les mêmes à pH 7 ou pH 8,6. Nous pouvons dès lors supposer que les points isoélectriques de ces deux formes enzymatiques sont identiques ou très proches l'une de l'autre.

Cette hypothèse a été testée par la technique de l'électrofo-
calisation entre pH 3 et pH 10 (cfr. alinéa 3.4.5 pour la des-
cription de la technique), et appliquée sur la SOD-Cu Zn puri-
fiée (figure 37 a); sur la SOD-Cu Zn incubée 2 h à 4°C dans une
"fraction cytoplasmique" g51-g52 (figure 37-b); sur la SOD-Cu Zn
tétramérique isolée après passage sur sephadex G 75 (figure 37-c).

Cette expérience montre que nous ne pouvons mettre en
évidence de différence significative entre le point isoélectrique
de la SOD-Cu Zn native (a) et le point isoélectrique de la SOD-Cu Zn
modifiée (c); leur point isoélectrique reste en effet localisé
entre pH 5 et pH 5,5. Ceci suggère donc également que les migra-
tions différentes sur agarose 1,5 % de la SOD-Cu Zn modifiée
(tétramérique) et normale (dimérique) s'expliqueraient par des
tailles de molécules très différentes. En effet, l'agarose 1,5 % peut
freiner des molécules dont le poids moléculaire est proche de 70.000.

Globalement, nous constatons que la "fraction cytoplasmique"
vieille (g51-g52) de fibroblastes WI-38 provoque des modifications
pour environ 30 à 40 % de l'enzyme SOD-Cu Zn normale après 2 h
d'incubation à 4°C et pH 9. Ces modifications sont au moins au
nombre de trois : (1) thermolabilisation accrue (70°C - pH 9),
(2) "tétramérisation" de la forme native
(sephadex G 75),
(3) mobilité électrophorétique ralentie de la
forme modifiée (électrophorèse sur Agarose
A₃₇ pH 7 et pH 8,6).

Ces modifications ne s'accompagnent pas d'un changement du
point isoélectrique de la forme SOD-Cu Zn modifiée en électrofo-
calisation entre pH 3 - pH 10.

Par les mêmes techniques, nous allons maintenant examiner les
modifications enzymatiques qui apparaissent "in vivo" sur la SOD-Cu Zn
cytoplasmique de jeunes (g29-g30) et vieux (g51-g52) fibroblastes WI-38
en culture.

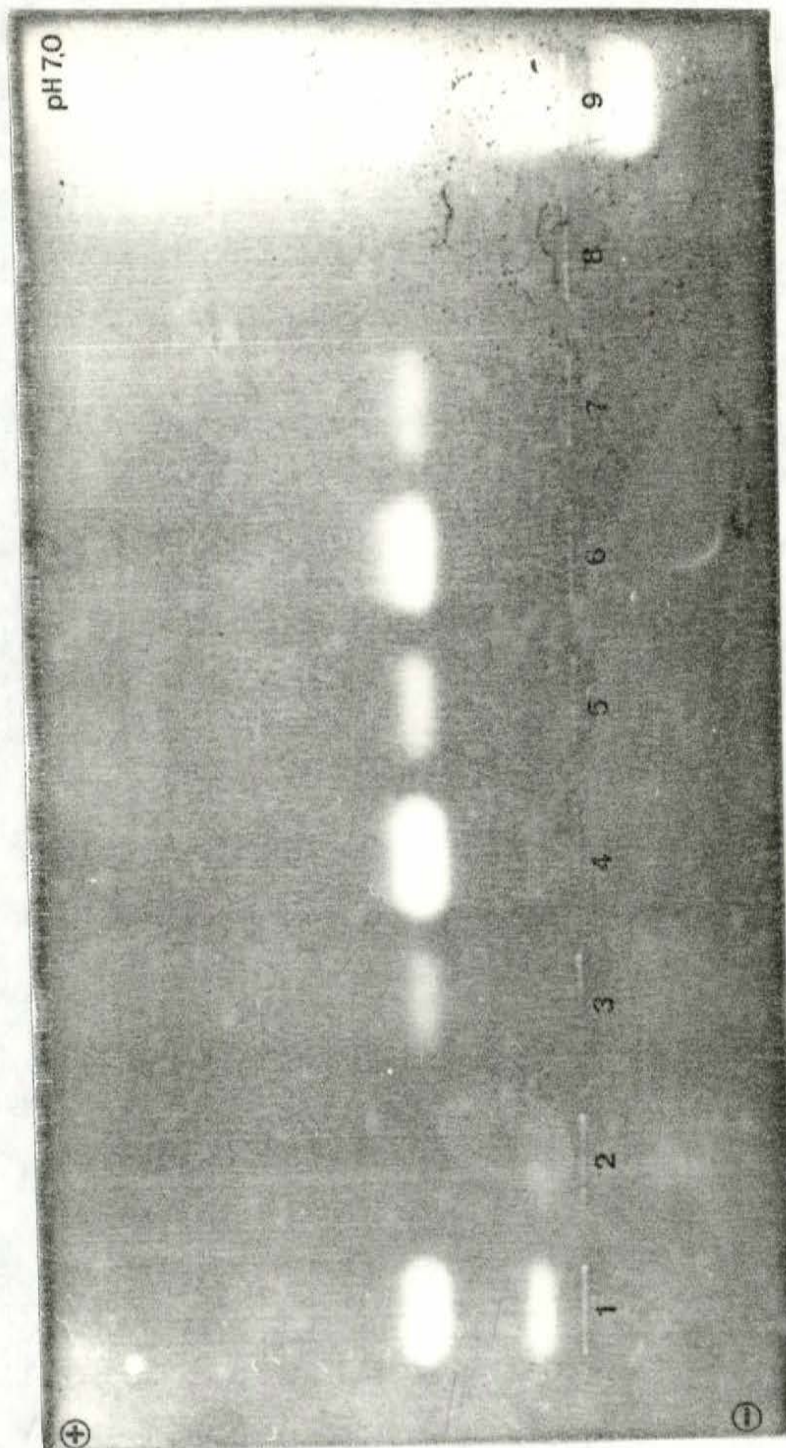


Figure 35 : Electrophorèse sur support Indubiose A₃₇ (Agarose IBF - 1,5 %) réalisée avec un tampon d'électrodes Na-phosphate 100 mM pH 7. L'électrophorèse est conduite 15 min sous 50V-35mA et ensuite 90 min. sous 150V-125mA. La révélation enzymatique est celle décrite par Beauchamp et Fridovich (1971). (1) 1 U. de SOD-Cu Zn incubée 2h à 4°C dans une "fraction cytoplasmique" g51-g52; (2) 0,125 U. de SOD-Cu Zn "tétramérique" (1° pic sur sephadex G 75); (3) 0,25 U. de SOD-Cu Zn dimérique (2° pic sur sephadex G 75); (4) 2 U. de SOD-Cu Zn incubée 2h à 4°C dans une "fraction cytoplasmique" g29-g30; (5) 0,5 U. de SOD pure dimérique (pic obtenu sur sephadex G 75); 1 U. (6) et 0,25 U. (7) de SOD-Cu Zn purifiée; (8) blanc contrôle; (9) Hémoglobine humaine.

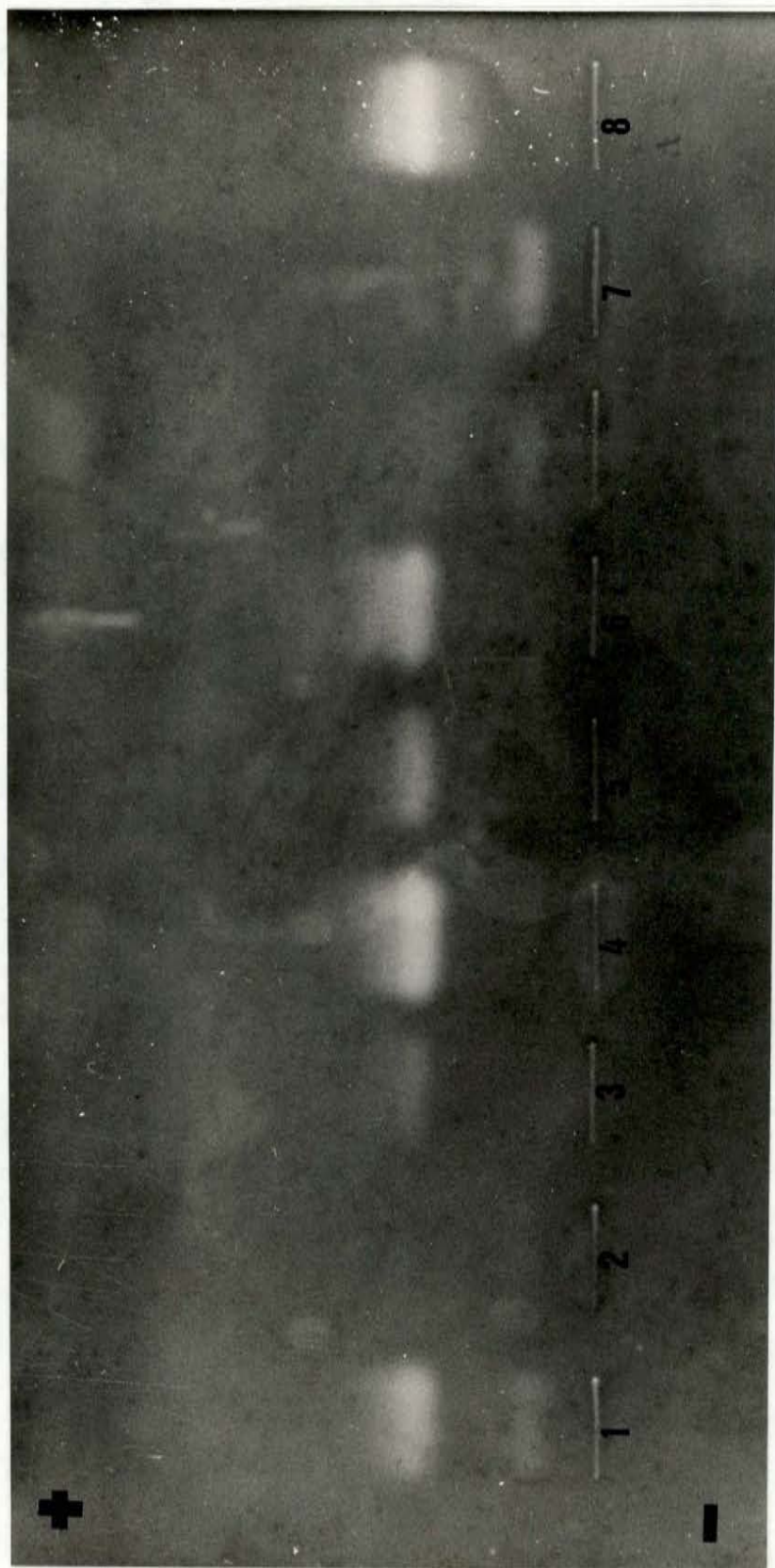


Figure 36 : Electrophorèse sur support Indubiose A37 (Agarose-IBF, 1,5 %) réalisée dans un tampon d'électrodes véronal 100 mM pH 8,6. L'électrophorèse est conduite 15 min. sous 50V-35mA. puis 60 min. sous 150V-125mA. La révélation enzymatique est celle décrite par Beauchamp et Fridovich (1971).

(1) 1 U. de SOD-Cu Zn incubée 2 h. à 4°C dans une "fraction cytoplasmique" g51-g52; (2) 0,125 U. des SOD-Cu Zn "tétramérique" (1° pic sur sephadex G 75); (3) 0,25 U. de SOD-Cu Zn dimérique (2° pic sur sephadex G 75); (4) 2 U. de SOD-Cu Zn incubée 2 h à 4°C dans une "fraction cytoplasmique" g29-g30; (5) 0,5 U. de SOD pure dimérique (pic obtenu sur sephadex G 75); (6) 1 U. de SOD-Cu Zn purifiée; (7) 0,5 U. de SOD tétramérique (cfr (2)); (8) hémoglobine humaine.

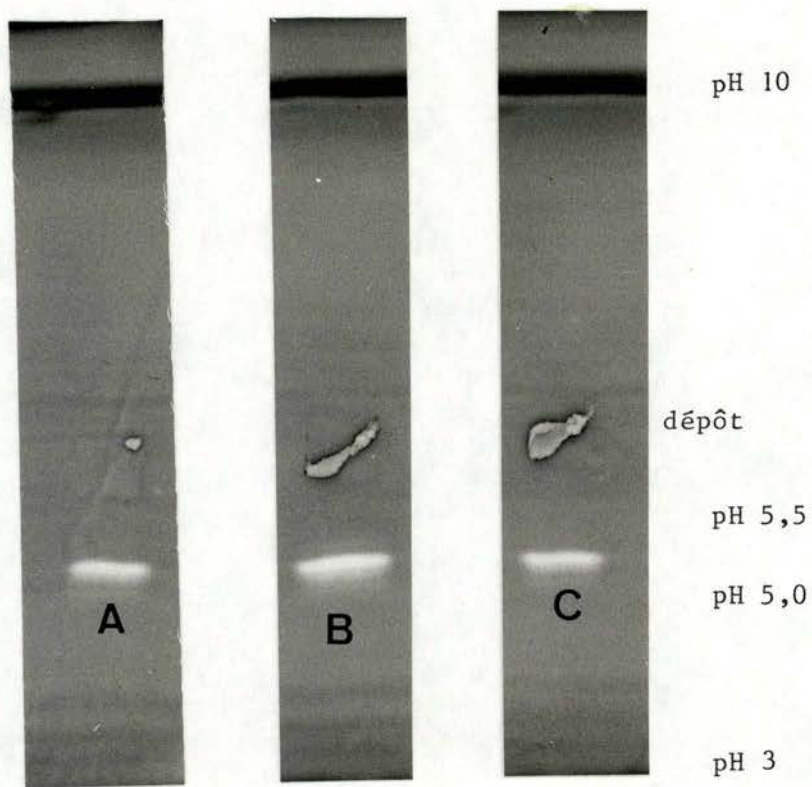


Figure 37 : électro-focalisation entre pH 3 - pH 10 réalisée sur gel de polyacrylamide.
(1 heure sous 200V-14mA puis 2 heures sous 550V-8,6mA)
Les échantillons sont placés au milieu du gel (← dépôt) sur papier Whatman. La révélation enzymatique est celle décrite par Beauchamp et Fridovich (1971).

- A) 0,5 U. de SOD-Cu Zn cytoplasmique (sigma)
- B) 0,5 U. de SOD-Cu Zn incubée 2 h à 4°C dans une "fraction cytoplasmique" g51-g52.
- C) 0,5 U. de SOD-Cu Zn "tétramérique" isolée par passage sur sephadex G 75.

3.7.2 Caractéristiques de la SOD-Cu Zn cytoplasmique de fibro-
blastes WI-38 (g29-g30 et g51-g52) en culture

L'approche expérimentale que nous allons suivre consiste à caractériser les modifications que peuvent présenter les SOD-Cu Zn cytoplasmiques de jeunes (g29-g30) fibroblastes WI-38 en culture. Les techniques utilisées sont essentiellement identiques à celles adoptées précédemment. Ainsi, après centrifugation des homogénats de fibroblastes WI-38, les "fractions cytoplasmiques" (8mg protéines totales) sont placées sur une colonne de sephadex G 75 (0,5 x 79 cm) et éluées à 4°C par un tampon SET pH 9. Les profils d'élution sont analysés en fonction de leur contenu en activité dismutasique. (figure 38 et figure 39).

L'élution réalisée sur le cytoplasme g29-g30 présente deux pics d'activité dismutasique localisés à environ 64.000 et 32.000 daltons (pics a et b, figure 38). Le premier représente 10 % de l'activité dismutasique totale. Dans le cas de l'élution du cytoplasme g51-g52 (figure 39) le profil d'activité dismutasique est différent du profil d'activité dismutasique g29-g30 (figure 38). Deux pics sont présents, l'un situé à environ 64.000 daltons l'autre situé à 32.000 daltons. Le premier pic d'activité représente 58,5% de l'activité dismutasique totale. Pour chaque cytoplasme jeune et vieux, nous nous trouvons en présence de pics qui, s'ils varient fortement dans leur importance relative, sont cependant localisés à 64.000 et 32.000 daltons. Rapidement, nous avons identifié le pic de poids moléculaire 32.000 correspondant à l'élution de la SOD-Cu Zn dimérique pure (cfr. figure 33 a). Pour les pics de poids moléculaire 64.000, nous devons émettre plusieurs hypothèses. (a) La première suggère que le pic 64.000 du cytoplasme jeune est, soit une contamination mitochondriale (tétramérique), soit l'apparition précoce d'une forme SOD-Cu Zn cytoplasmique modifiée (figure 38).

(b) La deuxième suggère que ce même pic de poids moléculaire 64.000 observé dans les cytoplasmes vieux est, soit une contamination mitochondriale (peu probable), soit l'identification d'une forme SOD-Cu Zn modifiée (tétramérique), soit enfin, l'expression d'une contamination mitochondriale additionnée à une population SOD-Cu Zn cytoplasmique modifiée (figure 39).

L'expérience la plus efficace pour répondre à ces hypothèses, consiste à utiliser la différence de points isoélectriques qui existe entre la SOD mitochondriale (pI 8-9) et la SOD cytoplasmique (pI 5-6). Ainsi, l'élution terminée, nous avons réalisé des électro-focalisations entre pH 3 et pH 10 sur chacun des pics d'activité dismutasique d'origine cytoplasmique jeune (g29-g30) (figure 40) et cytoplasmique âgée (g51-g52) (figure 41).

Dans le cas du cytoplasme jeune (g29-g30), nous constatons qu'il y a contamination de l'enzyme mitochondriale (figure 40 a). Cela est confirmé par l'électrofocalisation du pic d'activité dismutasique élué à 25 ml (tétramères) qui présente exclusivement les isoenzymes SOD-Mn mitochondriales (figure 40 b). Enfin, l'électrofocalisation du pic dimère élué à 31 ml donne uniquement une bande d'activité dismutasique localisée au point isoélectrique de la SOD-Cu Zn cytoplasmique (figure 40 c).

Dans le cas du cytoplasme vieux (g51-g52), nous constatons également une contamination importante de la SOD mitochondriale (SOD-Mn) (figure 41 a). Cette contamination se trouve en présence de SOD-Cu Zn cytoplasmique modifiée dans le pic élué à 23 ml (tétramère) (figure 41 b). L'électrofocalisation du pic élué à 30 ml (dimère) donne exclusivement une bande d'activité SOD-Cu Zn cytoplasmique (figure 41 c).

Globalement, nous constatons que l'enzyme SOD-Cu Zn jeune garde sa conformation dimérique. Par contre, il apparaît une forme SOD-Cu Zn "tétramérique" dans le cytoplasme des fibroblastes WI-38 g51-g52. Cependant, cette forme enzymatique modifiée n'est pas quantifiable par l'électrofocalisation. Ce qui est par contre évident, c'est qu'elle garde un point isoélectrique identique à la forme SOD-Cu Zn cytoplasmique non modifiée.

De plus, si l'on se réfère à la figure 24, on remarquera que l'électrofocalisation entre pH 4 et pH 6 d'une "fraction cytoplasmique" de cellules WI-38 g29-g30 ou g51-g52 présente au moins 3 isoenzymes dont, ni les points isoélectriques, ni la distribution quantitative, ne changent au cours de la sénescence de la culture cellulaire.

Ces résultats acquis, nous avons réalisé des courbes de thermoinactivation à 70°C et pH 9 sur chacun des pics d'activités dismutasiques élué à partir d'une fraction cytoplasmique jeune g29-g30 (figure 42), et vieille g51-g52 (figure 43). Les paramètres des fonctions ajustées pour ces courbes sont présentés dans le tableau 13.

a) Par comparaison entre les valeurs des paramètres présentés au tableau 8 et ceux présentés au tableau 13, nous montrons :

1. que la constante de vitesse de dénaturation (b_1) du contaminant mitochondrial n'est pas différente du paramètre b_1 de l'activité SOD mitochondriale d'origine jeune (g29-g30).
2. que le paramètre b_1 de la SOD-Cu Zn isolée du cytoplasme jeune est à la limite du seuil de différence significative par rapport à la constante de vitesse de dénaturation de la même enzyme non isolée.

b) Nous constatons au tableau 13 que la SOD-Cu Zn dimérique d'origine cytoplasmique âgée (g51-g52) présente une constante de vitesse de dénaturation semblable à la SOD-Cu Zn dimérique jeune (g29-g30),

c) Enfin, nous ne pouvons montrer que la constante de vitesse de dénaturation de la SOD-Cu Zn "tétramérique" (+ contaminant mitochondrial) (tableau 13) est significativement différente du paramètre b_1 de l'activité dismutasique cytoplasmique de fibroblastes âgés (g51-g52) (tableau 8). La valeur estimée - relativement faible - de la constante de vitesse de dénaturation du pic d'activité SOD-Cu Zn "tétramérique" (+ contaminant mitochondrial) n'est sans doute pas étrangère à la contamination mitochondriale observée ici.

De tout ceci, nous pouvons conclure que les cytoplasmes jeunes de fibroblastes WI-38 (g29-g30) possèdent une seule population SOD-Cu Zn qui est dimérique, de poids moléculaire 32.000, de thermolabilité homogène et dont les points isoélectriques sont compris entre 5 et 6. Par contre, les cytoplasmes vieux de fibroblastes WI-38 (g51-g52) possèdent au moins deux populations SOD-Cu Zn qui sont : l'une tétramérique, de poids moléculaire 64.000, de thermolabilité accrue et dont les points isoélectriques sont identiques à l'enzyme jeune; l'autre (environ 60 à 70 % de l'activité dismutasique totale), est comparable à l'enzyme SOD-Cu Zn cytoplasmique jeune.

De plus, l'exigence d'une quantité d'antisérum plus importante pour précipiter une activité dismutasique de cytoplasmes âgés serait liée au phénomène d'agrégation en conformation tétramérique des molécules âgées. Ceci rendrait compte d'une diminution d'activité dismutasique par unité d'antigène (figure 28).

Dans le chapitre suivant, nous abordons l'étude de différents facteurs affectant le comportement de la SOD-Cu Zn modifiée.

SURNAGEANT g 29-g30

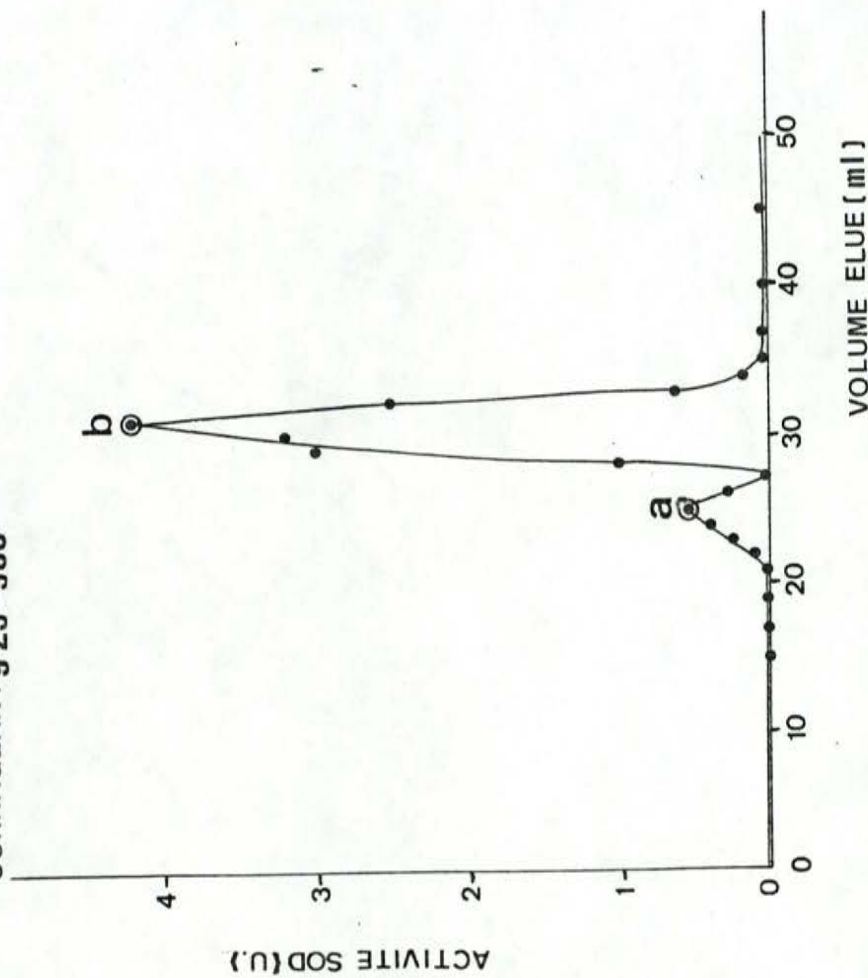


Figure 38

SURNAGEANT g51-g52

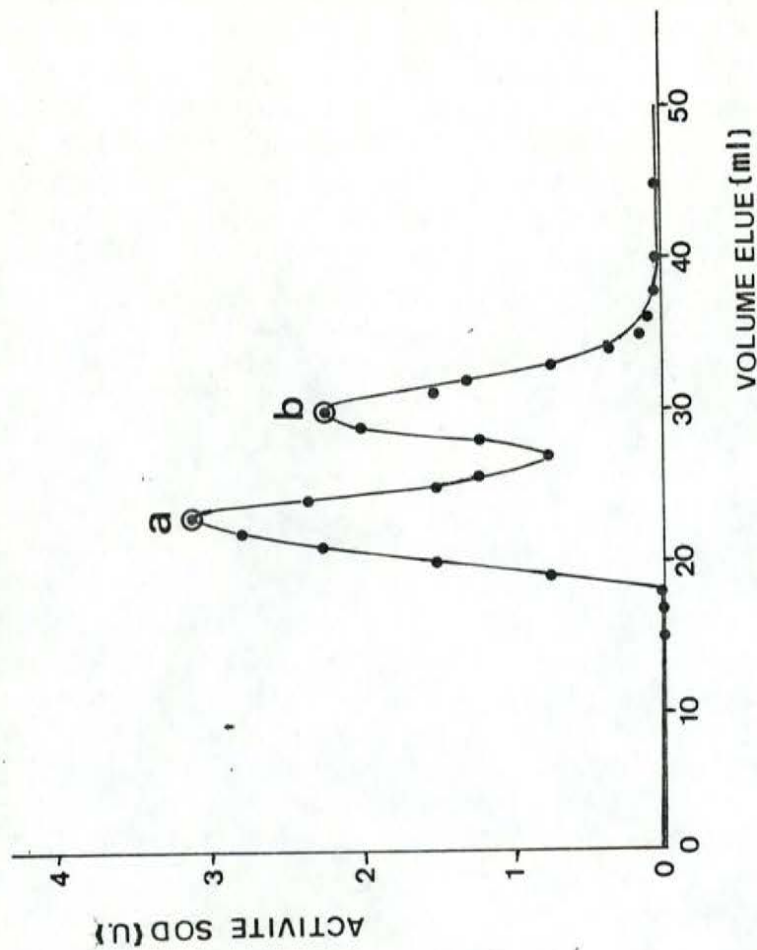


Figure 39

Figures 38 et 39 : Profils d'élution de l'activité dismutasique obtenus à partir de fractions cytoplasmiques (8 mg protéines) de fibroblastes WI-38 (g29-g30) et (g51-g52), chromatographiées sur sephadex G 75 dans un tampon SET pH 9 à 4°C avec un débit de 4 ml/Heure.

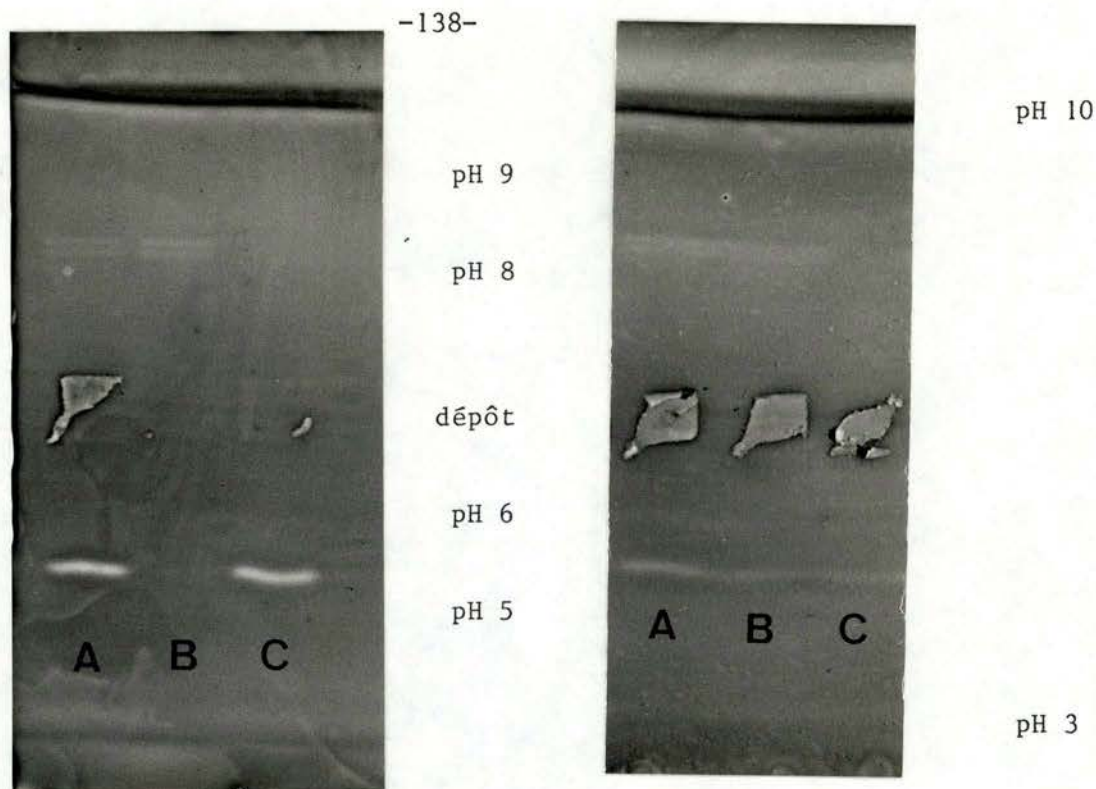


Figure 40 (gauche) et figure 41 (droite)

Electrofocalisations sur gel d'acrylamide entre pH 3 et pH 10 (1 h sous 200V-14mA puis 2 h sous 550V-8,6mA). Les échantillons sont placés au milieu du gel (←dépôt→) sur papier Whatman. La révélation enzymatique est celle décrite par Beauchamp et Fridovich (1971).

figure 40 : a) 0,5 U. d'activité dismutasique du cytoplasme g29-g30.
 b) 0,125 U. d'activité dismutasique du pic élué à 25 ml (contaminant mitochondrial) (figure 38).
 c) 0,5 U. d'activité dismutasique du pic élué à 31 ml (SOD-Cu Zn dimérique cytoplasmique) (figure 38).

figure 41 : a) 0,5 U. d'activité dismutasique du cytoplasme g51-g52.
 b) 0,5 U. d'activité dismutasique du pic élué à 23 ml (contaminant mitochondrial + SOD-Cu Zn cytoplasmique modifiée) (figure 39).
 c) 0,5 U. d'activité dismutasique du pic élué à 30 ml (SOD-Cu Zn dimérique) (figure 39).

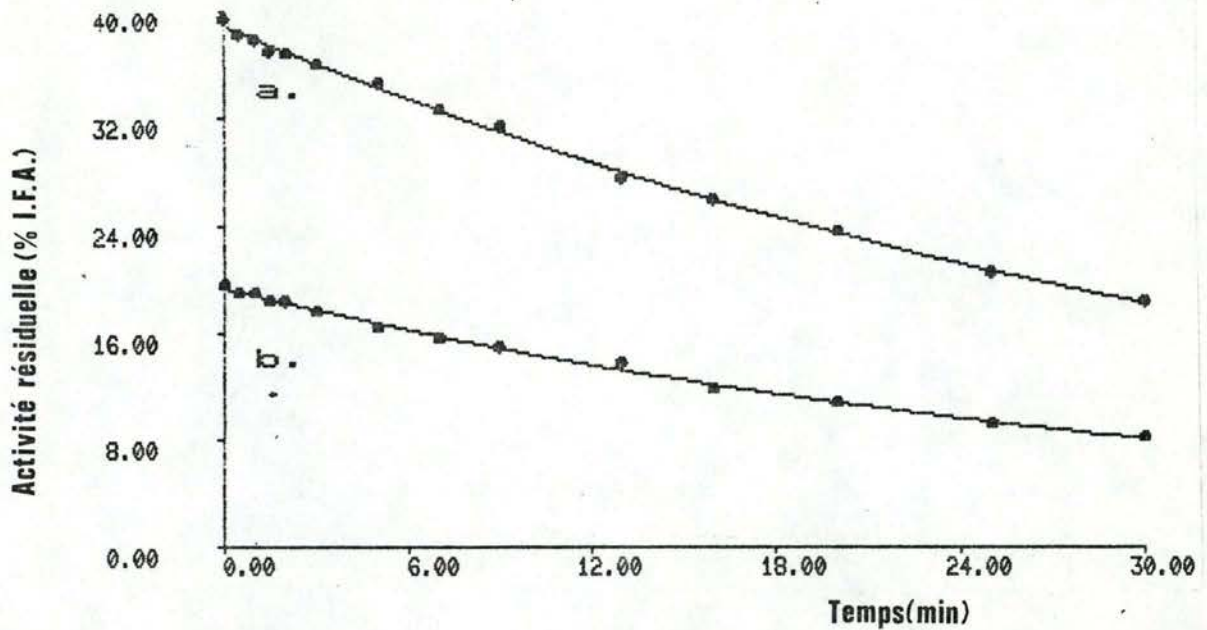


Figure 42 :

Courbes de thermoinactivation effectuées à 70°C dans un tampon SET pH 9,0 à partir du profil d'élution sur sephadex G 75 d'une fraction cytoplasmique de fibroblastes WI-38 g29-g30 (figure 38).

- a) courbe de thermoinactivation réalisée sur le pic d'activité SOD-Cu Zn dimérique (élution à 31 ml).
- b) courbe de thermoinactivation réalisée sur le pic d'activité SOD-Mn mitochondriale contaminante et tétramérique (élution à 25 ml).

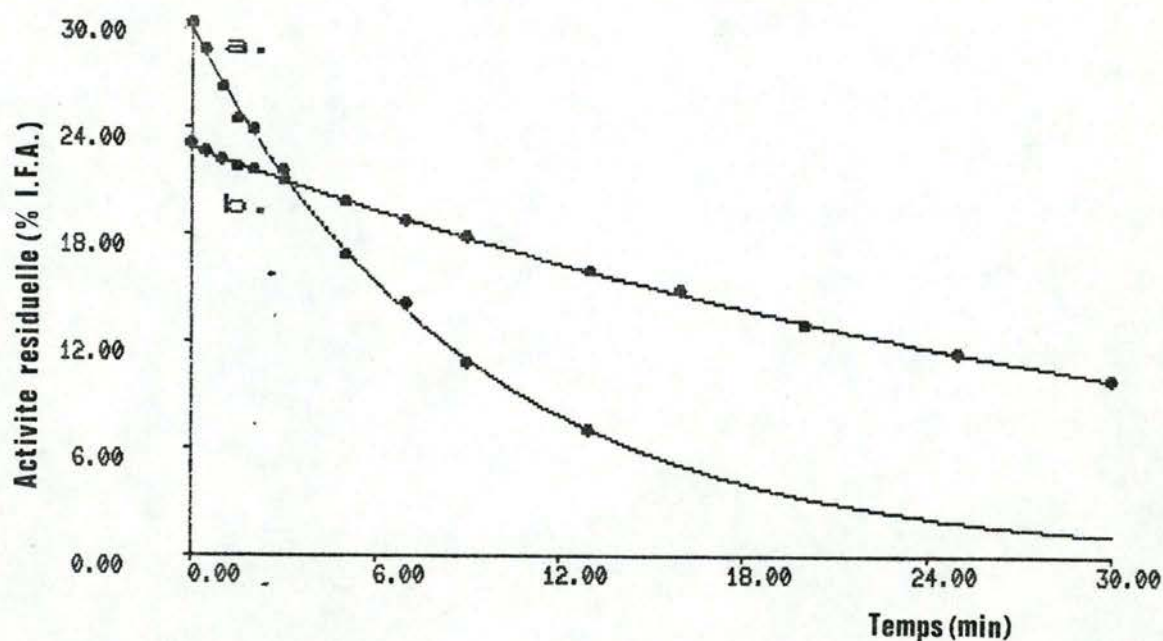


Figure 43 :

Courbes de thermoinactivation effectuées à 70°C dans un tampon SET pH 9 à partir du profil d'élution sur sephadex G 75 d'une fraction cytoplasmique de fibroblastes WI-38 g51-g52 (figure 39).

- a) courbe de thermoinactivation réalisée sur le pic d'activité SOD-Cu Zn modifiée et le contaminant mitochondrial tétramérique (élution à 23 ml).
- b) courbe de thermoinactivation réalisée sur le pic d'activité SOD-Cu Zn dimérique (élution à 30 ml).

$$y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$$

Activités dismutasiques fibroblastes WI-38 fractions cytoplasmiques	n*	valeurs des paramètres + 2 s. (° I.F.A.) ^u				CRM [•]
		a ₁	b ₁	a ₂	b ₂	
<u>g29-g30</u>						
SOD-Cu Zn dimérique	14	38,79 ± 0,26	0,025 ± 0,006	-	-	0,313
Contaminant mitochondrial tétramérique	14	19,29 ± 0,19	0,029 ± 0,010	-	-	0,226
<u>g51-g52</u>						
SOD-Cu Zn dimérique	14	22,80 ± 0,09	0,028 ± 0,004	-	-	0,144
Pic d'activité "tétra- mérique" (+ contaminant mitochondrial)	10	29,58 ± 0,36	0,111 ± 0,040	-	-	0,327

Tableau 13 : Ajustement de la fonction $y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$ pour les courbes de thermalités (70°C, pH 9) réalisées sur les pics d'activités dismutasiques (après passage sur sephadex G 75) des cytoplasmes jeunes g29-g30 (figures 38 et 42) et vieux g51-g52 (figures 39 et 43).

- * nombres de points expérimentaux
- ^u % d'inhibition de la formation d'adrénochrome
- ° 2 écart-types
- non détectable
- carré moyen résiduel

3.8 Etude de différents facteurs affectant la SOD-Cu Zn modifiée

Cette étude se compose de deux volets. L'un traitera de facteurs influençant la SOD-Cu Zn modifiée artificiellement, l'autre de facteurs influençant la SOD-Cu Zn modifiée "in vivo" pendant la sénescence cellulaire.

3.8.1 Facteurs affectant la SOD-Cu Zn modifiée artificiellement

Pour aborder ce chapitre, nous devons rendre compte d'une observation particulièrement intéressante liée à la SOD-Cu Zn cytoplasmique et érythrocytaire purifiée.

Congelés à -70°C pendant une période allant de quelques jours à 1 mois, ces SOD-Cu Zn présentaient un phénomène de polymérisation de la forme dimérique native vers la forme tétramérique sans perte d'activité enzymatique. Ce phénomène déjà observé par Weisiger et Fridovich (1973 a) sur la SOD-Cu Zn cytoplasmique de poulet fut expliqué par l'existence de groupes sulfhydryles qui pourraient réagir comme réducteurs endogènes et former des ponts disulfures intermoléculaires. La chromatographie sur sephadex G 75 de l'enzyme polymérisée redonnait un profil d'élution unimodal comparable à celui de l'enzyme fraîche si le tampon d'élution contenait du mercaptoéthanol 1 %. De même, le traitement de l'enzyme polymérisée par de la L-cystéine 0,1 % redonnait une forme enzymatique identique à la forme native. Ces auteurs concluaient donc à la formation de ponts disulfures intermoléculaires réversibles et non critiques pour l'activité enzymatique.

Cet artéfact ne peut intervenir dans notre étude car :

- 1) nos expériences sont réalisées sans congélation préalable
- 2) la fraction tétramérique SOD-Cu Zn cytoplasmique n'apparaît sélectivement que dans les cytoplasmes vieux ou lors d'incubation de l'enzyme native purifiée dans ces mêmes cytoplasmes vieux.

Cependant, les conclusions de Weisiger et Fridovich nous ont suggéré l'hypothèse qu'au cours du vieillissement cellulaire, le cytoplasme vieux devient progressivement moins réducteur et entraîne l'oxydation de groupements SH de la SOD-Cu Zn qui polymériserait l'enzyme dimérique en tri-et tétramérique avec ou sans perte concomitante d'activité (Gershon 1979; Halliwell 1978; Truscott et Augusteyn 1977).

Nous avons donc réalisé l'expérience suivante : après incubation dans une fraction cytoplasmique de fibroblastes WI-38 g51-g52, la SOD-Cu Zn pure est chromatographiée sur colonne sephadex G75 (4°C - tampon SET pH 9). La population SOD-Cu Zn tétramérique est alors incubée avec du mercaptoéthanol 1 % et éluée de suite sur colonne sephadex G 75 (4°C - tampon SET pH 9 + 1 % mercaptoéthanol) (figure 44).

Nous constatons que l'élution de la forme "tétramérique" (figure 44 ●-●) est retardée et localisée au niveau du passage de la forme dimérique lorsqu'elle est chromatographiée en présence de mercaptoéthanol 1 % (figure 44 ○-○). Cependant, la même forme "tétramérique" isolée et placée sur sephadex G 75 sans mercaptoéthanol donne également un profil d'élution retardé et localisé en partie au niveau de la sortie de la forme dimérique (non montré).

Ces observations laissent donc supposer l'existence d'un équilibre entre la forme dimérique et la forme tétramérique. Cependant, l'application de traitements sur la SOD-Cu Zn tétramérique par la L-cystéine ou le glutathion ne semble pas modifier cet état d'équilibre). Enfin, si l'expérience réalisée ci-dessus en présence de mercaptoéthanol 1 % plaide en faveur de l'existence de ponts disulfures intermoléculaires, nous n'avons pas pu confirmer cette hypothèse par titration des groupements SH libres de l'enzyme dimérique et tétramérique.

Indépendamment de cette dernière remarque, il semble donc que la forme "tétramérique" induite par le cytoplasme vieux soit en équilibre avec la forme dimérique originelle.

3.8.2 Facteurs influençant la SOD-Cu Zn modifiée "in vivo".

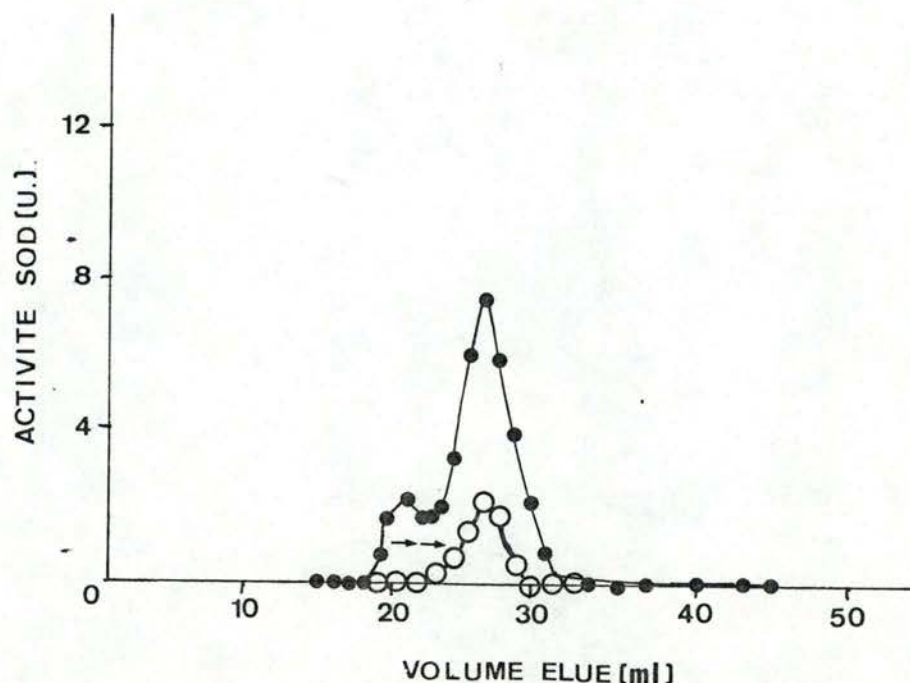


Figure 44 : Chromatographie sur sephadex G 75 (4°C - tampon SET pH 9) d'une solution de SOD-Cu Zn pure incubée en présence de cytoplasme vieux g51-g52 (●-●). La forme "tétramérique" isolée et replacée sur colonne sephadex G 75 (4°C - tampon SET pH 9 + mercaptoéthanol 1 %) donne un profil d'élution identique à celui de la forme SOD-Cu Zn originelle (○-○).

Afin de mieux comprendre ce qui pouvait modifier physiologiquement le superoxyde dismutase cytoplasmique au cours de la sénescence cellulaire, nous nous sommes référé à l'ensemble du mécanisme de défense de la cellule contre l'oxygène (figure 11).

La description globale de ce mécanisme laisse entrevoir l'importance du couple redox $\text{NADP}^+ - \text{NADPH}$. En effet, A. Houben (1981) suggère que l'altération et l'inactivation de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase peut entraîner une déficience en NADPH. Celle-ci se marquera par une accumulation de glutathion oxydé non recyclé et la perte progressive du potentiel réducteur de la cellule (par manque de glutathion réduit); elle entraînera l'impossibilité de reconversion de l'acide déhydroascorbique en acide ascorbique et la non fonctionnalité de la glutathione peroxydase (qui transforme H_2O_2 et les hydroperoxydes); enfin elle empêchera la reconversion du radical α -tocophéryl en α -tocophérol.

De plus, il semble que le NADPH et le NADP^+ , protègent "in vitro" la glucose-6-phosphate déshydrogénase de l'altération liée à la sénescence et peuvent "réversibiliser" "in vivo" la forme altérée existant dans le cytoplasme de fibroblastes WI-38 âgés (Houben 1981). Nous nous sommes dès lors posé la question de savoir si ce mécanisme protecteur avait également un impact sur la SOD-Cu Zn modifiée de fibroblastes WI-38 âgés; et si oui, quelle était l'évolution du taux de NADPH et NADP^+ dans les cellules au cours de la sénescence. Enfin, nous avons réalisé une première analyse de l'impact de la vincamine sur le comportement des cellules en culture et spécifiquement sur le comportement de la SOD-Cu Zn cytoplasmique.

a) Effet du NADPH sur la SOD-Cu Zn cytoplasmique modifiée

L'incubation 2 h à 4°C pH 7,4 et au pH 9 d'une fraction cytoplasmique de fibroblastes vieux WI-38 (g52-g53) en présence de NADPH 1 ou 5 mM ne permet plus de visualiser une hétérogénéité de la constante de vitesse de dénaturation de la SOD-Cu Zn cytoplasmique (figure 45). Le NADPH reste inerte au dosage de l'activité

dismutasique. De plus, nous n'avons pas pu montrer une influence du NADP^+ dans l'expérience décrite ci-dessus. Dans le tableau 14, sont présentés les paramètres de la fonction $y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$ estimés à partir des courbes de la figure 45.

Nous constatons que la thermolabilité de la population SOD-Cu Zn "tétramérique" qui représente 47,36 % de l'activité totale, présente une constante de vitesse de dénaturation ($1,12 \pm 0,22$) (tableau 14) supérieure à celle estimée pour la même enzyme à la génération g51-g52 (tableau 8-d). Ceci s'expliquerait dans la mesure où les cellules testées étaient au stade ultime de leur vie en culture. Cependant, le profil de la courbe de thermolabilité obtenue sur la même enzyme incubée en présence de NADPH 1mM (2h, 4°C, pH 9) donne une seule constante de vitesse de dénaturation dont l'estimation mathématique est comparable à celle de la SOD-Cu Zn cytoplasmique jeune (g29-g30) (cfr tableau 8-a). Sachant que le NADPH n'interfère pas dans le dosage de la SOD, nous devons donc émettre l'hypothèse du rôle protecteur du NADPH sur la SOD-Cu Zn cytoplasmique et sa capacité de "réversibiliser" le processus de "polymérisation" de cette enzyme qui apparaît au cours de la sénescence cellulaire. Le corollaire de cette hypothèse sera donc qu'au cours du vieillissement, le "pool" de NADPH décroît. Pour étayer cette hypothèse et son corollaire, nous avons d'abord analysé les quantités de NADPH présentes dans les cellules jeunes (g28-g29), d'âge moyen (g42-g43) et vieilles (g51-g52), ensuite, nous avons analysé en électrophorèse sur support Indubion A₃₇, le comportement de la SOD pure incubée avec du NADP^+ ou du NADPH (figure 46) et finalement, le comportement électrophorétique de la SOD-Cu Zn modifiée artificiellement et "in vivo" pendant la sénescence de la culture, en absence et en présence de NADPH (figure 47).

$$y(t) = a_2 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$$

Activité dismutasique fibroblastes WI-38 g52-g53 fraction cytoplasmique	* n	Valeurs des paramètres $\pm 2 s^{\circ}$ (% I.F.A.) ^a				CMR [•]
		a ₁	b ₁	a ₂	b ₂	
a) contrôle	11	10,15 \pm 0,90	1,120 \pm 0,220	11,28 \pm 0,64	0,011 \pm 0,004	0,132
b) + 1 mM NADPH 2 h, 4°C, pH 9	9	22,57 \pm 0,30	0,018 \pm 0,001	-	-	0,078

Tableau 14 : Ajustement de la fonction $y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$ pour les courbes de thermolabilités (70°C, tampon SET pH 9) réalisées sur la SOD-Cu Zn cytoplasmiques g52-g53 en absence (a) et en présence de NADPH 1mM (incubation 2 h, 4°C pH 9).

* nombres de points expérimentaux

□ % d'inhibition de la formation d'adrénochrome

° 2 écart -types

• carré moyen résiduel

- non détectable

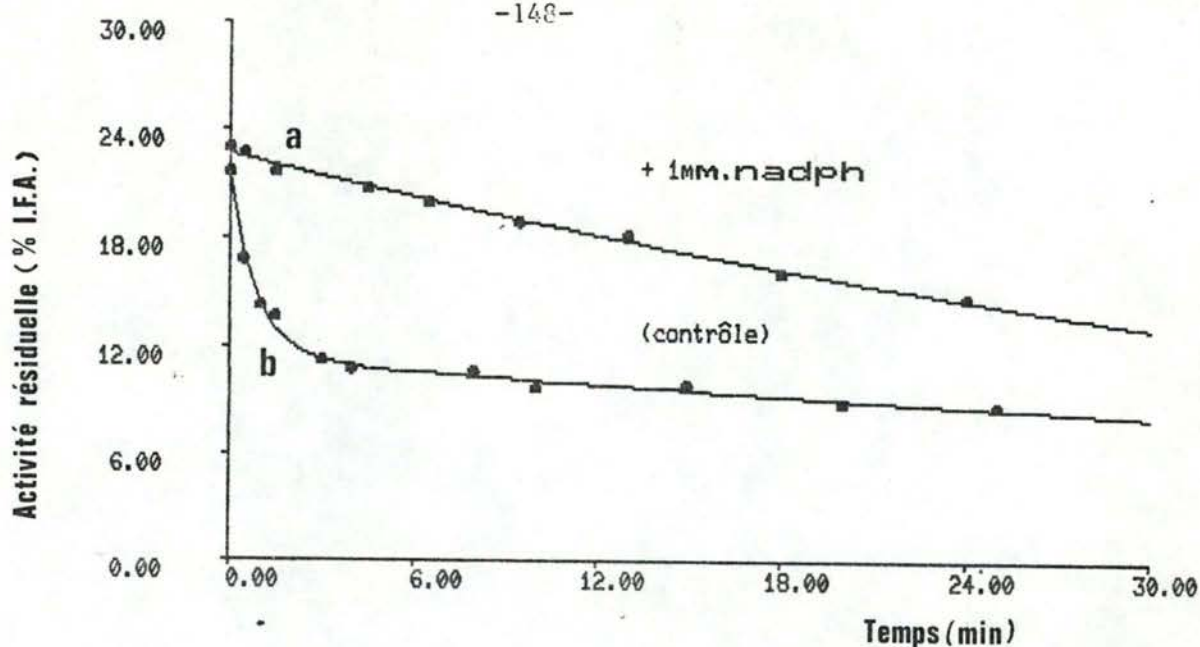


Figure 45 : Courbes de thermoinactivation à pH 9 et 70°C, d'une fraction cytoplasmique de fibroblastes WI-38 g52-g53 préalablement incubée en présence (courbe a) ou en absence (courbe b) de NADPH 1 mM (2 h 4°C, pH 9). L'incubation à pH 7,4 donne le même résultat (non montré).

b) Analyse du contenu en NADPH des fibroblastes WI-38 en culture

Le principe du dosage consiste en l'oxydation du NADPH cellulaire par une NADPH : FMN oxydoréductase avec réduction simultanée d'une flavine mononucléotide (FMN) en flavine mononucléotide réduite (FMNH_2). Cette dernière molécule en présence de luciférase bactérienne, d' O_2 et d'une solution d'aldéhydes à longues chaînes, produit l'émission de photons dont la lecture est réalisée à 495 nm. Le kit d'analyse utilisé est celui proposé par la firme Lumac (Lumase P kit for measurement of NADPH cat n° 4781).

Les premiers résultats que nous avons obtenus sur cellules jeunes et âgées, ne permettent pas de conclure que le NADPH intracellulaire (environ $2,25 \cdot 10^{-10}$ moles/mg protéines) décroît ou augmente au cours de la sénescence des fibroblastes.

c) Electrophorèses sur indubiose A₃₇-tampon phosphate pH 7,4

Dans un premier temps, des lots de 100 μ l (10 U. SOD) de SOD-Cu Zn purifiée, ont été soit incubés en présence de NADPH 5 mM ou 1 mM; soit incubés en présence de NADP⁺ 5 mM ou 1 mM. De plus, les incubations sont réalisées à pH 7,4; les unes pendant 2 h à 4°C, les autres 2 h à 37°C (figure 46).

Nous constatons que la SOD-Cu Zn purifiée ne voit pas sa charge modifiée par des incubations de 2 h à 37 ou 0°C, en présence de NADP⁺. Dans le cas de la même forme SOD-Cu Zn dimérique purifiée, incubée en présence de NADPH 1mM ou 5mM, la température est indifférente mais cette fois, il apparaît une fraction d'activité dismutasique plus anodique par rapport à la forme enzymatique originelle (figure 46). Nous n'avons pas actuellement d'explication de ce phénomène; cependant, il ne semble pas s'agir d'un artéfact lié à une activité "pseudo dismutasique" du NADPH.

Ces résultats nous ont suggéré alors d'effectuer les mêmes expériences sur les formes enzymatiques modifiées artificiellement (SOD pure + fraction cytoplasmique g52-g53) et sur les formes enzymatiques présentes naturellement pendant la sénescence des fibroblastes WI-38 en culture (figure 47).

Nous constatons que la forme SOD-Cu Zn modifiée artificiellement ou naturellement dans le cytoplasme de fibroblastes âgés (figure 47,(2-9) et (5-11)) présente deux bandes d'activités dismutasiques : la plus lente étant la forme SOD-Cu Zn "tétramérique" plus thermolabile, l'autre étant la forme SOD-Cu Zn dimérique à thermolabilité normale. Ce dernier point est confirmé par les contrôles SOD-Cu Zn dimériques placés à la figure 47 en position (3) et (7).

La SOD-Cu Zn originaire du cytoplasme g52-g53 (figure 47,(5)) voit sa bande d'activité plus thermolabile disparaître en présence de NADPH 5mM (figure 47,(6)) avec l'apparition d'une bande d'activité plus anodique.



Figure 46 : Electrophorèse sur support Indubiose A₃₇ (Agarose-IBF, 1,5 %) réalisée dans un tampon d'électrodes 100 mM Na-phosphate pH 7,4. L'électrophorèse est conduite 15 min sous 50V-52mA puis 90 min sous 150V-125mA. La révélation enzymatique est celle décrite par Beauchamp et Fridovich (1971)

A1 :	1U.	SOD-Cu Zn + NADP 5mM (2 h 37°C)
A2 :	"	" (2 h 4°C)
A3 :	1U.	SOD-Cu Zn + NADP 1mM (2 h 37°C)
A4 :	"	" (2 h 4°C)
C1 :	0,25U.	SOD-Cu Zn (2 h. 4°C)
C2 :	1U.	SOD-Cu Zn (2 h. 37°C)
b1 :	1U.	SOD-Cu Zn + NADPH 1mM(2 h 4°C)
b2 :	"	" (2 h 37°C)
b3 :	1U.	SOD-Cu Zn + NADPH 5mM(2 h 4°C)
b4 :	"	" (2 h 37°C)
d :	Hémoglobine humaine.	

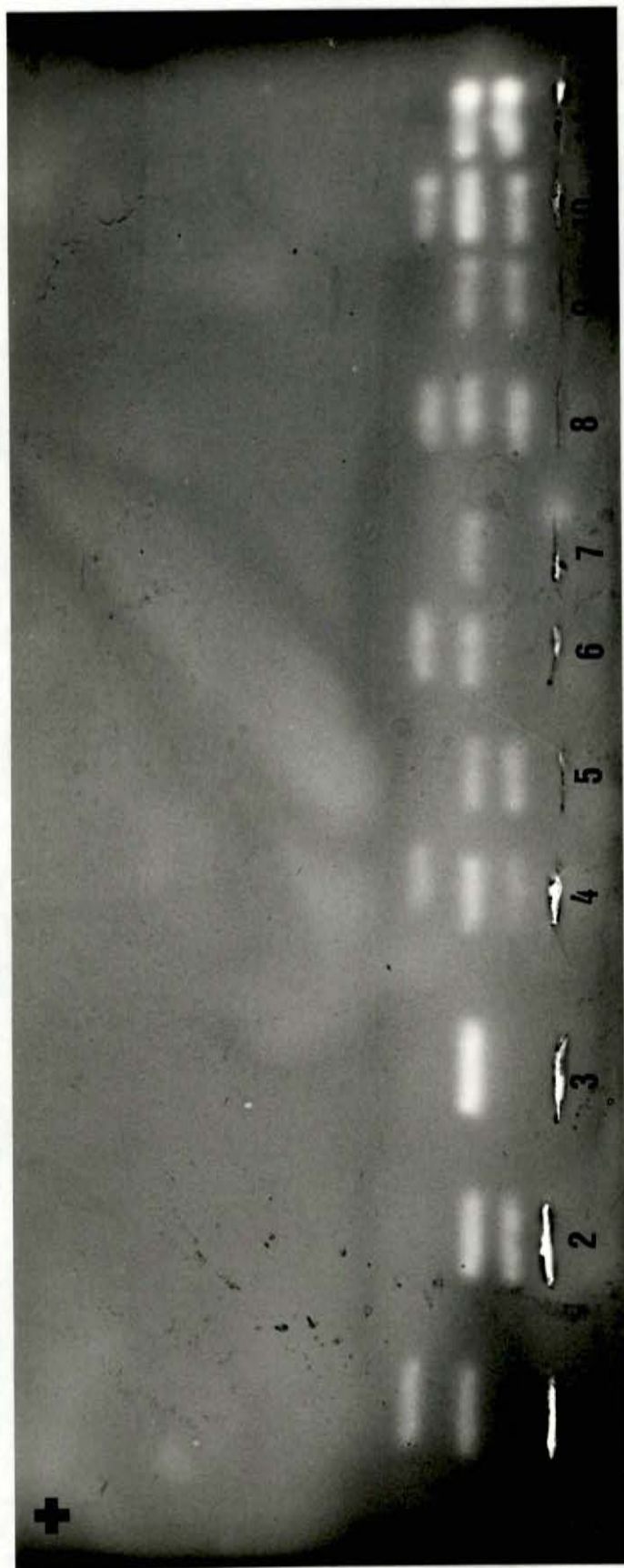


Figure 47 : Electrophorèse sur support Indubion A₃₇ (Agarose-IBF, 1,5 %) réalisée dans un tampon d'électrodes 100 mM Na-phosphate pH 7,4. L'électrophorèse est conduite 15 min sous 50V-50mA puis 90 min sous 150V-125mA. La révélation enzymatique est celle décrite par Beauchamp et Fridovich (1971). Tous les échantillons sont préalablement incubés 2 h à 4°C et pH 7,4.

- (1) 1U.SOD-Cu Zn pure + NADpH 5mM
- (2) 1U.SOD-Cu Zn pure + fraction cytoplasmique g52-g53 épuisée en SOD
- (3) 1U.SOD-Cu Zn pure
- (4) idem (2) + NADpH 5mM
- (5) 1U.SOD-Cu Zn cytoplasmique g52-g53
- (6) idem (5) + NADpH 5mM
- (7) 0,25U. SOD-Cu Zn pure
- (8) idem (4) concentré 3x sur membrane Amicon B15
- (9) idem (2)
- (10) idem (4) concentré 6x sur membrane Amicon B15
- (11) idem (5) concentré 4x sur membrane Amicon B15

Par contre, l'influence du NADPH 5mM sur la migration des bandes d'activité SOD-Cu Zn pure incubées en présence d'une fraction cytoplasmique g52-g53 est plus difficilement interprétable dans la mesure où la bande d'activité dismutasique plus cathodique semble seulement s'estomper légèrement (figure 47, (4,8,10)) par rapport à la même expérience réalisée sur la SOD Cu Zn d'origine cytoplasmique âgée (figure 47, (6)).

De tout ceci, nous suggérons l'hypothèse suivante :

Au cours du vieillissement cellulaire, l'apparition d'une forme SOD-Cu Zn plus thermolabile, de migration électrophorétique lente, de poids moléculaire 64.000, pourrait être le résultat d'une déficience en NADPH engendrée par un dysfonctionnement progressif du cycle des pentoses phosphates (Houben 1981) ou par d'autres facteurs que nous ne maîtrisons pas actuellement. Nous ne pouvons conclure ici sur le mécanisme précis qui favoriserait le passage d'équilibre d'une forme tétramérique vers une forme dimérique et inversement. Tout au plus, pouvons nous suggérer que ce mécanisme impliquerait "in vivo" un maintien du potentiel réducteur de la cellule.

F.Mbemba (Lab. Prof. J. Remacle) semble montrer qu'au cours de la sénescence cellulaire des fibroblastes WI-38, ceux-ci perdent environ 30 % de la production normale de glutathion réduit (résultats non publiés). De plus, Ohrloff et al. (1980) ont montré des pertes d'activités en glutathione réductase et glutathione peroxydase, de l'ordre de 50 % au cours du vieillissement global du cristallin de bovin.

Ces pertes d'activités s'accompagnent au niveau des couches vieilles du cristallin, d'une augmentation importante de leur thermolabilité. Ces auteurs suggèrent une décroissance de la

stabilité conformationnelle des protéines qui conduit par modifications post-traductionnelles, à l'inactivation de la glutathione réductase et peroxydase. Ces modifications s'accompagnent également d'une perte de GSH et donc d'une capacité à interférer dans le mécanisme de défense cellulaire contre les dérivés de l'oxygène.

d) Effet de la vincamine sur les cellules en culture

La vincamine-alcaloïde de *Vinca minor* L. (Schlittler et Furlenmeier 1953)-est une substance utilisée en gériatrie chez des patients qui présentent une régression des facultés mentales et physiques. La symptomatologie est généralement hétérogène et imprécise : troubles de la concentration, de la réflexion, de la mémoire, du sommeil, de l'affectivité et de l'humeur - dépression, irritabilité, rigidité affective, troubles du comportement social. En fait, ces symptômes semblent liés à un déficit du métabolisme neuronal dû à une carence d'apport et peu de captation d'éléments énergétiques.

Les études d'impact de la vincamine sur des tissus nerveux d'embryons de souris (André-Balisaux et al. 1977), sur des fibroblastes WI-38 (Remacle et al. 1982) montrent une stimulation de la croissance cellulaire liée à une reprise métabolique de la consommation en glucose et en oxygène. Il est à remarquer que cette augmentation de la capacité de synthèse cellulaire s'accompagne pour les fibroblastes WI-38 traités, d'une augmentation importante du pool de NADPH disponible. Enfin, l'analyse du comportement thermorésistant de la glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PD) de fibroblastes WI-38 g53-g54 cultivés 15 jours dans un milieu enrichi en vincamine $10^{-5}M$ montre que la forme G6PD plus thermolabile disparaît pour donner un profil de dénaturation homogène.

Pour notre part, nous avons enrichi en vincamine $10^{-5}M$ le milieu de culture de fibroblastes WI-38 g51-g52. Celui-ci a été renouvelé le 10^e jour et les dosages enzymatiques ont été effectués le 15^e jour de culture. Une même série de fibroblastes WI-38 g51-g52 servait de contrôle. Les courbes de thermorésistances sont présentées à la figure 48. Le tableau 15 reprend les valeurs estimées des paramètres des courbes de la figure 48.

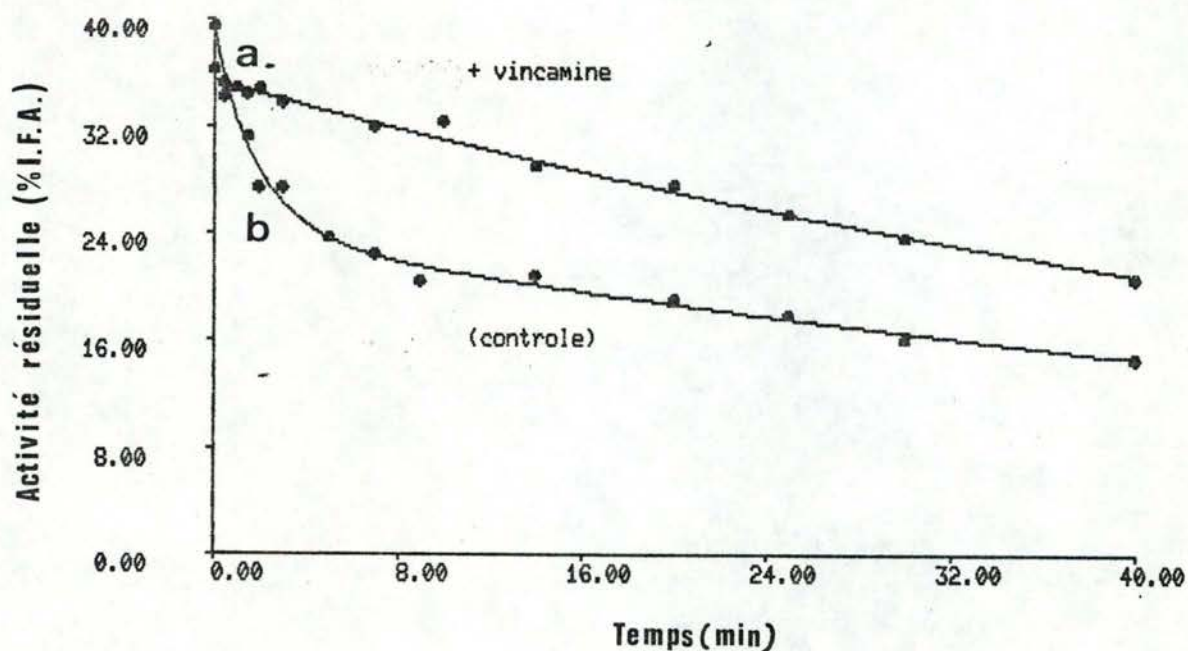


Figure 48 : Courbes de thermoinactivation à pH-9 et 70°C, d'une fraction cytoplasmique de fibroblastes WI-38 g51-g52 préalablement cultivés 15 jours en présence (courbe a) ou en absence (courbe b) de vincamine $10^{-5}M$.

$$y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$$

Activité dismutasique fibroblastes WI-38 g51- g52 fraction cytoplasmique	n*	valeurs des paramètres ± 2 s. (% I.F.A.) ^D				CMR ^E
		a ₁	b ₁	a ₂	b ₂	
a) Milieu culture (contrôle)	13	15,39 \pm 2,04	0,510 \pm 0,140	23,75 \pm 1,74	0,012 \pm 0,004	0,821
b) Milieu culture + 10 ⁻⁵ M. Vincamine	13	35,32 \pm 0,52	0,013 \pm 0,001	—	—	0,641

Tableau 15 : Ajustement de la fonction $y(t) = a_1 e^{-b_1 t} + a_2 e^{-b_2 t}$ pour les courbes de thermolabilités (70°C, tampon SET pH 9) réalisées sur la SOD-Cu Zn cytoplasmique de fibroblastes WI-38 g51-g52 préalablement cultivés 15 jours en absence (a) ou en présence de Vincamine 10⁻⁵M.

- * nombre de points expérimentaux
- % d'inhibition de la formation d'adrénochrome
- 2 écart -types
- carré moyen résiduel
- non détectable

Nous constatons que la constante de vitesse de dénaturation de la population SOD-Cu Zn plus thermolabile ($0,51 \pm 0,14$) (40 % de l'activité totale), n'est plus détectable lorsque les cellules sont préalablement cultivées 15 jours dans un milieu enrichi en $10^{-5}M$ vincamine.

Nous émettons donc l'hypothèse que la vincamine à un niveau de concentration $10^{-5}M$ "protège" l'enzyme d'une modification conformationnelle de la forme dimérique vers la forme tétramérique mais en plus, est capable de "réversibiliser" la forme tétramérique en dimérique. Nous avons constaté que la vincamine ne joue pas un rôle "protecteur" ou "réversibilisateur" sur les SOD modifiées d'homogénats de cellules vieilles à $4^{\circ}C$; nous suggérons donc que l'effet de la vincamine se manifeste indirectement en restaurant dans le cytoplasme de la cellule un environnement adéquat, notamment en augmentant le taux de NADPH, ce qui permettrait de maintenir les molécules de SOD cytoplasmiques dans leur conformation dimérique.

Etant donné l'absence d'un tableau complet sur les modifications métaboliques que produit la vincamine, nous ne précisons pas davantage les origines et conséquences de ce phénomène.

CHAPITRE IV - CONCLUSIONS GENERALES

Notre travail s'inscrit globalement dans l'analyse enzymatique du processus de vieillissement atteignant les fibroblastes WI-38 en culture. Deux axes de recherches sous-tendent ce travail. Le premier concerne l'analyse de la validité de la théorie de l'erreur catastrophique émise par Orgel en 1963 et généralisée en 1973. Le deuxième implique l'hypothèse des modifications protéiques post-traductionnelles (Dreyfus et al. 1978) et conformationnelles (Rothstein 1981).

Face à la première théorie d'Orgel (1963) qui explique le vieillissement par l'apparition d'erreurs au cours de la synthèse protéique, nos résultats montrent que les superoxyde dismutases se comportent différemment en fonction de leur localisation sub-cellulaire. Seule la SOD-Cu Zn cytoplasmique s'altère au cours du vieillissement. La SOD-Mn mitochondriale (non synthétisée au niveau du DNA mitochondrial) garde un état catalytique et une structure native stable en fonction de l'âge physiologique cellulaire. De plus, nos expériences mettent en évidence que la fraction SOD-Cu Zn cytoplasmique n'est altérée qu'à la condition d'être environnée d'un milieu cytoplasmique âgé. Il y a réversibilité de la forme plus thermolabile (signe d'une altération de l'enzyme) lorsque celle-ci est plongée dans un milieu cytoplasmique jeune. Ces observations s'accordent avec l'hypothèse des modifications protéiques post-traductionnelles.

Nos résultats perdent leur caractère contradictoire à la théorie d'Orgel de 1963 lorsque nous nous référons à la théorie généralisée du même auteur, proposée en 1973. En effet, Orgel englobe dans cette théorie toutes les causes qui seraient responsables d'erreurs au cours du vieillissement, à savoir, l'action des

radicaux libres, les modifications de "turn-over", les mutations somatiques, les modifications de la synthèse protéique, et également, l'hypothèse des modifications protéiques conformationnelles et post-traductionnelles. Cette théorie suggère aussi que les molécules enzymatiques cloisonnées dans les compartiments sub-cellulaires sont protégées par les membranes des organites et ne seraient donc pas touchées par les modifications survenant dans le cytoplasme au cours de la sénescence.

Nous constatons que l'apparition d'une forme enzymatique plus thermolabile de la SOD-Cu Zn cytoplasmique est liée à la qualité de l'environnement cytoplasmique vieux et se caractérise à la fois par une perte d'activité par unité d'antigène (matériel à réaction croisée), par une modification conformationnelle de la forme dimérique native vers la forme tétramérique (plus thermolabile), par une migration électrophorétique plus lente, par le maintien des points isoélectriques et la répartition qualitative des isoenzymes de la SOD-Cu Zn.

Nous mettons en évidence l'existence d'un équilibre entre la forme enzymatique SOD-Cu Zn modifiée et la SOD-Cu Zn native, qui peut être déplacée "in vitro", vers la forme native, par le mercaptoéthanol, le NADPH ou l'adjonction d'un environnement cytoplasmique jeune. Ce déplacement d'équilibre est également suggéré "in vivo" par l'effet de la vincamine sur les cellules en culture. Ces observations appuient l'hypothèse des modifications protéiques conformationnelles et post-traductionnelles. Cependant, l'effet du NADPH suggère que la présence d'enzymes modifiées ne serait pas une cause fondamentale du vieillissement, mais plutôt une conséquence des modifications apparues à un autre niveau dans le métabolisme.

Enfin, s'il apparaît que différents arguments peuvent être avancés pour constater une défaillance du mécanisme de défense de la cellule contre les dérivés de l'oxygène (production augmentée de radicaux libres et de MDA, induction de la peroxydation des lipides polyinsaturés, perte de glutathion réduit, d'anti-oxydants, pertes d'activité et thermolabilités accrues d'enzymes...), nos résultats restent insuffisants pour expliciter l'impact physiologique des SOD sur la sénescence cellulaire. Nous suggérons que l'analyse globale du mécanisme de défense des fibroblastes WI-38 contre les dérivés de l'oxygène est un élément important dans la compréhension physiologique du vieillissement cellulaire.

CHAPITRE V - BIBLIOGRAPHIE

- V. ALEMAN et P. HANDLER. - Dihydroorotate dehydrogenase.
J. BIOL. CHEM., 242 : 4087 - 4096, 1967.
- A. AMAR-COSTESECC, H. BEAUFAY, M. WIBO, D. THINES-SEMPOUX,
E. FEYTMANS, M. ROBBI et J. BERTHET. - Analytical
study of microsomes and isolated subcellular mem-
branes from rat liver. II. Preparation and composi-
tion of the microsomal fraction.
J. CELL. BIOL., 61 : 201 - 212, 1974.
- G. ANDRÉ-BALISAUX et F. DE PARMENTIER. - Effets de la Vincamine
sur des fibroblastes de poulet cultivés in vitro. Comptes
rendus des séances de la Société de Biologie.
TOME 168, n° 10-11-12, 1454, 1974.
- G. ANDRÉ-BALISAUX, H. VANALDERWEIRELDT et F. DE PARMENTIER.
- Effets de la Vincamine sur des tissus nerveux
d'embryons de souris cultivés in vitro.
- ARCH. BIOL. (BRUXELLES), 88 : 1 - 12, 1977.
- E. ANTONINI, M. BRUNORI, C. GREENWOOD et B.G. MALMSTRÖM. - Cata-
lytic mechanism of cytochrome oxidase.
NATURE , 228 : 936 - 937, 1970.
- K. ASADA, K. KISO et K. YOSHIKAWA. - Univalent reduction of
molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination.
J. BIOL. CHEM., 249 : 2175 - 2181, 1974.
- K. ASADA, S. KANEMATSU, M. TAKEHASHI et Y. KONA. - Superoxide
dismutases in photosynthetic organisms.
ADV. EXP. MED. BIOL., 74 : 551 - 564, 1976.
- S.D. AUST, D.L. ROERIG et T.C. PEDERSON. - Evidence for super-
oxide generation by NADPH - cytochrome C reductase of
rat liver microsomes.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 47 : 1133 - 1137, 1972.

- A.P. AUTOR, L. FRANK et R.J. ROBERTS. - Developmental characteristics of pulmonary superoxide dismutase : relationship to idiopathic respiratory distress syndrome. *PEDIAT. RES.*, 10 : 154 - 158, 1976.
- A.P. AUTOR, A.W. FOX et J.B. STEVENS. - Effect of oxygen and related radicals on rat pulmonary cells. *dans : Biochemical and clinical aspects of oxygen* ED : W.S. CAUGHEY
ACADEMIC PRESS, NEW YORK, 767 - 783, 1979.
- R. AXEN et S. ERNBACKE. - Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. *EUR. J. BIOCHEM.*, 18 : 351 - 360, 1971.
- B.M. BABIOR, R.S. KIPNES et J.T. CURNUTTE. - Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. CLIN. INVEST.*, 52 : 741 - 744, 1973.
- B.M. BABIOR, J.T. CURNUTTE et R.S. KIPNES. - Biological defense mechanisms : Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *J. LAB. CLIN. MED.*, 85 : 235 - 244, 1975.
- M.B. BAIRD, H.V. SAMIS, H.R. MASSIE et J.A. ZIMMERMAN. - A brief argument in opposition to the Orgel hypothesis. *GERONTOLOGIA*, 21 : 57 - 63, 1975.
- C. BALNY et P. DOUZOU. - Production of superoxide ions by photosensitization of Dyes. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.*, 56 : 386 - 391, 1974.
- A.A. BARBER et F. BERNHEIM. - Lipid peroxidation : its measurement, occurrence and significance in animal tissues. *ADVANCES IN GERONTOLOGY. RES.*, 2 : 355 - 403, 1967.

- D. BARRA, F. MARTINI, J.V. BANNISTER, M.E. SCHININA, G. ROTILIO, W.H. BANNISTER et F. BOSSA. - *The complete amino-acid sequence of human Cu/Zn superoxide dismutase.*
FEBS LETTERS, 120 : 53 - 56, 1980.
- C.O. BEAUCHAMP et I. FRIDOVICH. - *A mechanism for the production of ethylene from methional : the generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase.*
J. BIOL. CHEM., 245 : 4641 - 4646, 1970.
- C.O. BEAUCHAMP et I. FRIDOVICH. - *Superoxide dismutase : Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels.*
ANAL. BIOCHEM., 44 : 276 - 287, 1971.
- K.M. BEEM, W.E. RICH et K.V. RAJAGOPALAN. - *Total reconstitution of copper - zinc superoxide dismutase.*
J. BIOL. CHEM., 249 : 7298 - 7305, 1974.
- D. BEHAR, G. CZAPSKI, J. RABANI, L.M. DORFMAN et H.A. SCHWARZ. - *Acid dissociation - constant and decay kinetics of perhydroxyl radical.*
J. PHYS. CHEM., 74 : 3209 - 3213, 1970.
- F. BERNHEIM, M.L.C. BERNHEIM et K.N. VILBUR. - *The reaction between thiobarbituric - acid and the oxidation products of certain lipids.*
J. BIOL. CHEM., 174 : 257 - 264, 1948.
- B.H.J. BIELSKI et A.O. ALLEN. - *Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals.*
J. PHYS. CHEM., 81 : 1048 - 1050, 1977.
- J.M. BISHOP. - *Adverse effects of oxygen therapy in clinical practice.*
BULL. EUROP. PHYSIOPATH. RESP., 14 : 130, 1978.

I.B. BIZE, L.W. OBERLEY et H.P. MORRIS. - *Superoxide dismutase and superoxide radical in Morris hepatomas.*
CANCER RES., 40 : 3686 - 3693, 1980.

S. BJÖRKERUD. - *Studies of lipofuscin granules of human cardiac muscle. II. Chemical analysis of isolated granules.*
EXP. MOLEC. PATH., 3 : 377 - 389, 1964.

BMDP - 79. - P3R. *Nonlinear Regression.*

dans : BMDP. *Biomedical computer programs P - series.*

EDS : W.J. DIXON et M.B. BROWN

University of California press, Berkeley. Los Angeles.
LONDON. 464 - 483, 1979.

W. BORS, E. LENGFELDER, M. SARAN, C. FUCHS et C. MICHEL. -
*Reactions of oxygen radical species with methional :
A pulse radiolysis study.*
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 70 : 81 - 87, 1976.

B. BÖSTERLING et J.R. TRUDELL. - *Spin-Trap evidence for production of superoxide radical anions by purified NADPH - cytochrome P - 450 reductase.*
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 98 : 569 - 575, 1981.

G.H. BOURNE. - *Lipofuscin.*

dans : *Neurobiological Aspects of Maturation and Aging. Progress in Brain Research.*

ED. : D.H. FORD.

ELSEVIER SCI. PUBLI. NEW YORK., 187 - 202, 1973.

K. BRAWN et I. FRIDOVICH. - *Superoxide radical and superoxide dismutases : Threat and defense.*
ACTA. PHYSIOL. SCAN., (suppl) 492 : 9 - 18, 1980.

- L. BRITTON, D.P. MALINOWSKI et I. FRIDOVICH. - *Superoxide dismutase and oxygen metabolism in Streptococcus faecalis and comparison with other organisms.*
J. BACT., 134 : 229 - 236, 1978.
- G.R. BUETTNER et L.W. OBERLEY. - *The apparent production of superoxide and hydroxyl radicals by Hematoporphyrin and light as seen by spin-trapping.*
FEBS. LETTERS, 121 : 161 - 164, 1980.
- B. BULOS, B. SACKTOR, I.W. GROSSMAN et N. ALTMAN. - *Thyroid control of mitochondrial α -glycerolphosphate dehydrogenase in rat liver as a function of age.*
J. GERONTOL., 26 : 13 - 19, 1971.
- R.B. BURROWS et P.F. DAVISON. - *Comparison of specific activities of enzymes from young and old dogs and mice.*
MECH. AGE. DEV., 13 : 307 - 317, 1980.
- E. CADENAS, A. BOVERIS, C.I. RAGAN et A.O.M. STOPPANI. - *Production of superoxide radical and hydrogen peroxide by NADH : ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria.*
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 180 : 248 - 257, 1977.
- J.M. CAPASSO et J.A. ZIMMERMAN. - *Age-related alterations in the heat-stability of mouse heart phosphorylase.*
EXP. GERONTOL., 15 : 161 - 165, 1980.
- A. CARREL. - *On the permanent life of tissues outside of the organism.*
J. EXP. MED., 15 : 516 - 528, 1912.
- M.W. CHASE. - *dans : Methods in Immunology and immunochemistry*
EDS : C.A. WILLIAMS ET M.W. CHASE
ACADEMIC PRESS. NEW YORK, pp 197, 1967.

- R. COLEMAN, R.H. MICHELL, J.B. FINEAN et J.N. HAWTHORNE. - A purified plasma membrane fraction isolated from rat liver under isotonic conditions.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 135 : 573 - 579, 1967.
- A. COMFORT. - The mechanisms of senescence.
dans : *The Biology of senescence (Third edition)*
ED. : A. COMFORT.
CHURCHILL LIVINGSTONE, SCOTLAND, EDINBURGH, 199 - 237, 1979.
- R. CREAGAN, J. TISCHFIELD, F. RICCIUTI et F.H. RUDDLE. - Chromosome assignments of genes in man using mouse-human somatic cell hybrids : Mitochondrial superoxide dismutase (indophenol oxidase -B, tetrameric) to chromosome 6.
HUMANGENETIK., 20 : 203 - 209, 1973.
- P. CUATRECASAS. - Insulin-sepharose : immunoreactivity and use in the purification of antibody.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 35 : 531 - 536, 1969.
- P. CUATRECASAS. - Proteins purification by affinity. Chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide Beads.
J. BIOL. CHEM., 245 : 3059 - 3065, 1970.
- H.J. CURTIS. - The role of somatic mutations in aging
dans : *Topics in the Biology of Aging*.
ED. : P.L. KROHN.
INTERSCIENCE PUBLISHERS, 63 - 81, 1965.
- G. CZAPSKI. - Radiation chemistry of oxygenated aqueous solutions.
ANNU. REV. PHYS. CHEM., 22 : 171 - 208, 1971.

- L.K. DAHLE, E.G. HILL et R.T. HOLMAN. - *The Thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters.*
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 98 : 253 - 261, 1962.
- M. DANOT et H. GERSHON. - *The lack of altered enzymes molecules in "Senescent" mouse embryo fibroblasts in culture.*
MECH. AGE. DEV., 4 : 289 - 299, 1975.
- B.J. DAVIS. - *Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins.*
* ANN. NY. ACAD. SCI., 121 : 404 - 427, 1964.
- D.W. DEAMER et J. GONZALES. - *Autofluorescent structures in cultured WI-38 cells.*
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 165 : 421 - 426, 1974.
- L.R. DECHALET, M.R. COOPER et C.E. MC CALL. - *Stimulation of the hexose monophosphate shunt in human neutrophils by ascorbic acid : mechanism of action.*
ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY., 1 : 12 - 16, 1972.
- C. DE DUVE, B.C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX et F. APPELMANS. - *Tissue fractionation studies-6+ Inter-cellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissues.*
BIOCHEM. J., 60 : 604 - 617, 1955.
- C. DE DUVE, R. WATTIAUX et P. BAUDHUIN. - *Distribution of enzymes between subcellular fraction in animal tissues.*
ADV. ENZYMOLOGY., 24 : 291 - 358, 1962.
- C. DE DUVE et R. WATTIAUX. - *Functions of lysosomes.*
ANN. REV. PHYSIOL., 28 : 435 - 492, 1966.

R.F. DEL MAESTRO. - *An approach to free radicals in medicine and Biology.*

ACTA. PHYSIOL. SCAND., (Suppl). 492 : 153 - 168, 1980.

H.B. DEMOPOULOS, P. MILVY, S. KAKARI et J. RANSOHOFF. - *Molecular aspects of membrane structure in cerebral edema.*

dans : Steroids and Brain edema

EDS : H.J. REULEN et K. SCHÜRMANN.

SPRINGER-VERLAG, NEW YORK., 29 - 39, 1972.

C.J. DILLARD et A.L. TAPPEL. - *β -acetylhexosaminidase and other acid hydrolases of diploid WI-38 fibroblasts.*

BIOCHEM. MED., 11 : 275 - 289, 1974.

A. DOVRAT et D. GERSHON. - *Rat lens superoxide dismutase and glucose - 6 - phosphate dehydrogenase : studies on the catalytic activity and the fate of enzyme antigen as a function of age.*

EXP. EYE RES., 33 : 651 - 661, 1981.

J-C. DREYFUS, H. RUBINSON, F. SCHAPIRA, A. WEBER, J. MARIE et A. KAHN. - *Possible molecular mechanisms of ageing*
GERONTOLOGY, 23 : 211 - 218, 1977.

J-C. DREYFUS, A. KAHN et F. SHAPIRA. - *Posttranslational Modifications of Enzymes.*

dans : Current Topics in cellular regulation. vol : 14.

EDS : B. HORECKER et STADTMAN

ACADEMIC PRESS, INC. NEW YORK, SAN FRANCISCO, LONDON
243 - 297, 1978.

- J.C. DUNBAR et J.T. JOHANSEN. - Structural and functional properties of the Cu, Zn superoxide dismutases. BULL. EUROP. PHYSIOPATH. RESP., 17 (suppl) : 51 - 60, 1981.
- M.R. DUNCAN, R.T. DELL'ORCO et P.L. GUTHRIE. - Relationship of heat labile glucose - 6 - phosphate dehydrogenase and multiple forms of the enzyme in senescent human fibroblasts. J. CELL. PHYSIOL., 93 : 49 - 56, 1977.
- M.R. DUNCAN, R.T. DELL'ORCO et K.D. KIRK. - Superoxide dismutase specific activities in cultured human diploid cells of various donor ages. J. CELL. PHYSIOL., 98 : 437 - 442, 1979.
- H.EAGLE. - Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. SCIENCE., 122 : 501 - 504, 1955.
- P. EMMELOT, C.J. BOS, E.L. BENEDETTI et P.H. RUMKE. - Studies on plasma membranes. I. Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 90 : 126 - 145, 1964.
- L. EPEL et J. NEWMAN. - The mechanism of the oxidation of ascorbate and Mn^{2+} by chloroplasts. The role of the radical superoxide. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 325 : 520 - 529, 1973.
- J. EPSTEIN, J.R. WILLIAMS et J.B. LITTLE. - Deficient DNA repair in human progeroid cells. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 70 : 977 - 981, 1973.
- J.A. FEE et H.D. TEITELBAUM. - Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 49 : 150 - 158, 1972.

- J.A. FEE et P.E. DICORLETO. - Observations on the oxidation - reduction properties of bovine erythrocyte superoxide dismutase.
BIOCHEMISTRY., 12 : 4893 - 4899, 1973.
- J.A. FEE et R.G. BRIGGS. - Studies on the reconstitution of bovine erythrocyte superoxide dismutase. V. Preparation and properties of derivatives in which both zinc and copper sites contain copper.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 400 : 439 - 450, 1975.
- J.A. FEE et J.S. VALENTINE. - Chemical and physical properties of superoxide.
dans : Superoxide and Superoxide dismutases
EDS : A.M. MICHELSON, J.M. MC CORD and I. FRIDOVICH
ACADEMIC PRESS. NEW YORK, 19 - 60, 1977.
- J.A. FEE. - Is superoxide toxic ?
- dans : Biological and Clinical Aspects of Superoxide and superoxide dismutase.
EDS. : W.H. BANNISTER et J.V. BANNISTER
ELSEVIER/NORTH-HOLLAND 11 B : 41 - 48, 1980.
- J.A. FEE, J. PEISACH et W.B. MIMS. - Superoxide dismutase. Examination of the metal binding sites by electron spin echo spectroscopy.
J. BIOL. CHEM., 256 : 1910 - 1914, 1981.
- R.W. FESSENDEN et N.C. VERMA. - A time resolved electron spin resonance study of the oxidation of ascorbic acid by hydroxyl radical.
BIOPHYS. J., 24 : 93 - 101, 1978.
- B. FLEISCHER et S. FLEISCHER. - Preparation and characterization of Golgi membranes from rat liver.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 219 : 301 - 319, 1970.

- B.L. FLETCHER, C.J. DILLARD et A.L. TAPPEL. - Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in Biological Systems and tissues.
ANAL. BIOCHEM., 52 : 1 - 9, 1973.
- L. FLOHE. - Glutathione peroxidase. Fact and Fiction.
dans : Oxygen free radicals and tissue damage.
CIBA foundation symposium.
ESLEVIER/NORTH-HOLLAND, 65 : 95 - 122, 1979.
- K.L. FONG, P.B. MC CAY, J.L. POYER, B.B. KEELE et H. MISRA.
- Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl-free radicals produced during flavin enzyme activity.
J. BIOL. CHEM., 248 : 7792 - 7797, 1973.
- H.J. FORMAN et I. FRIDOVICH. - On the stability of bovine superoxide dismutase. The effect of metals.
J. BIOL. CHEM., 248 : 2645 - 2649, 1973.
- S. FOWLER, H. SHIO et H. WOLINSKY. - Subcellular fractionation and morphology of calf aortic smooth muscle cells. Studies on whole aorta, aortic explants, and subcultures grown under different conditions.
J. CELL. BIOL., 75 : 166 - 184, 1977.
- I. FRIDOVICH. - Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase.
J. BIOL. CHEM., 245 : 4053 - 4057, 1970.
- I. FRIDOVICH. - Evidence for the symbiotic origin of mitochondria
LIFE SCI., 14 : 819 - 826, 1974 a.
- I. FRIDOVICH. - Superoxide dismutases.
ADVANC. ENZYMOL., 41 : 35 - 97, 1974 b.

- I. FRIDOVICH. - *Superoxide dismutases.*
ANN. REV. BIOCHEM., 44 : 147 - 159, 1975.
- I. FRIDOVICH. - *Les superoxydes ou les dangers de la vie aérobie.*
LA RECHERCHE n° 92 : 743 - 749, 1978 a.
- I. FRIDOVICH. - *The Biology of oxygen radicals.*
SCIENCE., 201 : 875 - 880, 1978 b.
- I. FRIDOVICH. - *Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic life style.*
PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG., 28 : 733 - 741, 1978 c.
- H. GERSHON et D. GERSHON. - *Detection of inactive enzyme molecules in aging organisms.*
NATURE (LONDON), 227 : 1214 - 1217, 1970.
- H. GERSHON et D. GERSHON. - *Inactive enzyme molecules in aging mice : Liver aldolase.*
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 70 : 909 - 913, 1973.
- H. GERSHON et D. GERSHON. - *Altered enzyme molecules in senescent organisms : Mouse muscle aldolase.*
MECH. AGE. DEV., 2 : 33 - 41, 1973 a.
- D. GERSHON et H. GERSHON. - *An evaluation of the "Error catastrophe" theory of ageing in the light of recent experimental results.*
GERONTOLOGY, 22 : 212 - 219, 1976.
- D. GERSHON. - *Current status of age altered enzymes : alternative mechanisms.*
MECH. AGE. DEV., 9 : 189 - 196, 1979.
- G.O. GEY, W.D. COFFMAN et M.T. KUBICEK. - *Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium.*
CANCER RES., 12 : 264 - 265, 1952.

- D. GIVOL, Y. WEINSTEIN, M. GORECKI et M. WILCHEK. - A general method for the isolation of labeled peptides from affinity labeled Proteins.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 38 : 825 - 830, 1970.
- G.A. GLASS et D. GERSHON. - Enzymatic changes in rat erythrocytes with increasing cell and donor age: loss of superoxide dismutase activity associated with increases in catalytically defective forms.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM., 103 : 1245 - 1253, 1981.
- A.L. GOLDBERG. - Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*.
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 69 : 422 - 426, 1972.
- A.L. GOLDBERG et J.F. DICE. - Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells.
ANN. REV. BIOCHEM., 43 : 835 - 869, 1974.
- A.L. GOLDBERG et A.C. ST. JOHN. - Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells : part 2.
ANN. REV. BIOCHEM., 45 : 747 - 803, 1976.
- S. GOLDSTEIN et E.J. MOERMAN. - Heat-labile enzymes in Werner's syndrome fibroblasts.
NATURE, 255 : 159, 1975.
- S. GOLDSTEIN, D. STOTMAN et R.A.J. CORDEIRO. - Decreased proteolysis and increased amino acid efflux in aging human fibroblasts.
MECH. AGE. DEV., 5 : 221 - 233, 1976.
- I.M. GOLDSTEIN et G. WEISSMANN. - Effects of the generation of superoxide anion on permeability of liposomes.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 75 : 604 - 609, 1977.

- G. GOPINATH et P. GLEES. - Mitochondrial genesis of lipofuscin in the mesencephalic nucleus of the V nerve of aged rats.
ACTA. ANAT., 89 : 14 - 20, 1974.
- P. GOREN, A.Z. REZNICK, U. REISS et D. GERSHON. - Isoelectric properties of nematode aldolase and rat liver superoxide dismutase from young and old animals.
FEBS LETTERS, 84 : 83 - 86, 1977.
- G. GRAFF, J.H. STEPHENSON, D.B. GLASS, M.K. HADDOX et N.D. GOLDBERG.
- Activation of soluble splenic cell guanylate cyclase by prostaglandin endoperoxides and fatty acid hydroperoxides.
J. BIOL. CHEM., 253 : 7662 - 7676, 1978.
- E.M. GRÉGORY et I. FRIDOVICH. - Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen.
J. BACTERIOL., 114 : 543 - 548, 1973 a.
- E.M. GRÉGORY et I. FRIDOVICH. - Oxygen toxicity and the superoxide dismutase.
J. BACTERIOL., 114 : 1193 - 1197, 1973 b.
- E.M. GREGORY et I. FRIDOVICH. - Oxygen metabolism in Lactobacillus plantarum.
J. BACTERIOL., 117 : 166 - 169, 1974 a.
- E.M. GREGORY, S.A. GOSCIN et I. FRIDOVICH. - Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eukaryote.
J. BACTERIOL., 117 : 456 - 460, 1974 b.
- S.K. GUPTA et M. ROTHSTEIN. - Triose phosphate isomerase from young and old Turbatrix aceti.
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 174 : 333 - 338, 1976 a.
- S.K. GUPTA et M. ROTHSTEIN. - Phosphoglycerate kinase from young and old Turbatrix aceti.
BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA., 445 : 632 - 644, 1976 b.

F. HABER et J. WEISS. - *The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts.*

PROC. ROY. SOC. LOND. A, 147 : 332 - 351, 1934.

B. HALLIWELL. - *Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase : Solutions to the problems of living with O₂.*

NEW PHYTOLOGIST ., 73 : 1075 - 1086, 1974.

B. HALLIWELL. - *An attempt to demonstrate a reaction between superoxide and hydrogen peroxide.*

FEBS. LETTERS, 72 : 8 - 10, 1976.

B. HALLIWELL. - *Superoxide and hydroxylation reactions.*

dans : Superoxide and Superoxide dismutases

EDS : A.M. MICHELSON, J.M. MC CORD et I. FRIDOVICH
ACADEMIC PRESS, LONDON NEW YORK -SAN FRANCISCO.

335 - 349, 1977.

B. HALLIWELL. - *Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms : the key role of superoxide dismutase.*

CELL. BIOL. INT. REPORTS., 2 : 113 - 128, 1978.

G.A. HAMILTON et R.D. LIBBY. - *The valence of copper and the role of superoxide in the D-galactose oxidase catalyzed reaction.*

BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 55 : 333 - 340, 1973.

G.A. HAMILTON. - *Chemical models and mechanisms of oxygenases*
dans : Molecular Mechanisms of Oxygen Activation
ED. : O. HAYAISHI.

ACADEMIC PRESS NEW YORK, 405 - 451, 1974.

- J.J. HARDING. - *Altered heat-lability of a fraction of glutathione reductase in aging human lens.*
BIOCHEM. J., 134 : 995 - 1000, 1973.
- C.B. HARLEY, J.W. POLLARD, J.W. CHAMBERLAIN, C.P. STANNERS et S. GOLDSTEIN. - *Protein synthetic errors do not increase during aging of cultured human fibroblasts.*
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 77 : 1885 - 1889, 1980.
- D. HARMAN. - *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.*
- J. GERONTOL., 11 : 298 - 300, 1956.
- D. HARMAN. - *Role of free radicals in mutations, cancer, aging, and the maintenance of life.*
RADIATION RES., 16 : 753 - 763, 1962.
- D. HARMAN. - *Prolongation of life : role of free radical reactions in aging.*
- J. AMER. GERIATRICS SOC., 17 : 721 - 735, 1969.
- D. HARMAN. - *Free radical theory of aging : Nutritional implications.*
AGE, 1 : 143 - 152, 1978.
- J.I. HARRIS et H.M. STEINMAN. - *Amino-acid sequence homologies among superoxide dismutases.*
dans : Superoxide and Superoxide dismutases.
EDS : A.M. MICHELSON, J.M. MC CORD et I. FRIDOVICH.
ACADEMIC PRESS, LONDON - NEW YORK - SAN FRANCISCO.,
225 - 230, 1977.
- R.G. HARRISON. - *Observations on the living developing nerve fiber.*
PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 4 : 140 - 143, 1907.

- J.W. HARTZ, S. FUNAKOSHI et H.F. DEUTSCH. - The levels of superoxide dismutase and catalase in human tissues as determined immunochemically.
CLIN. CHIM. ACTA., 46 : 125 - 132, 1973.
- M. HASAN et P. GLEES. - Ultrastructural age changes in hippocampal neurons, synapses and neuroglia.
EXP. GERONT., 8 : 75 - 83, 1973.
- H.M. HASSAN et I. FRIDOVICH. - Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli*.
J. BACTERIOL., 129 : 1547 - 1553, 1977.
- H.M. HASSAN et I. FRIDOVICH. - Superoxide dismutases : Detoxication of a free radical.
dans : ENZYMATIC BASIS OF DETOXIFICATION.
ACADEMIC PRESS. INC. 1 : 311 - 332, 1980.
- C.E. HATCHIKIAN, J. LE GALL et G.R. BELL. - Significance of superoxide dismutase and catalase activities in the strict anaerobes, sulfate reducing bacteria.
dans : Superoxide and Superoxide dismutases.
EDS. A.M. MICHELSON, J.M. MC CORD et I. FRIDOVICH.
ACADEMIC PRESS, LONDON - NEW YORK - SAN FRANCISCO.,
159 - 172, 1977.
- N. HAUGAARD. - Cellular mechanisms of oxygen toxicity.
PHYSIOL. REV., 48 : 311 - 345, 1968.
- L. HAYFLICK et P.S. MOORHEAD. - The serial cultivation of human diploid cell strains.
EXP. CELL. RES., 25 : 585 - 621, 1961.
- L. HAYFLICK. - The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains.
EXP. CELL. RES., 37 : 614 - 636, 1965.

- L. HAYFLICK. - *The cellular basis for biological aging*
dans : *Handbook of the Biology of aging*
EDS. : C.E. FINCH et L. HAYFLICK
VAN NOSTRAND REINHOLD C^o., 169 -186, 1977.
- L. HAYFLICK. - *Recent advances in the cell biology of aging.*
MECH. AGE. DEV., 14 : 59 - 79, 1980.
- D.D. HENDLEY, A.S. MILDVAN, M.C. REPORTER et B.L. STREHLER.
- *The properties of isolated human cardiac age*
pigment. I. Preparation and physical properties.
J. GERONTOL., 18 : 144 - 150, 1963.
- J. HEWITT et J.G. MORRIS. - *superoxide dismutase in some obli-*
gately anaerobic bacteria.
FEBS. LETTERS., 50 : 315 - 318, 1974.
- F. HIRATA et O. HAYAISHI. - *Possible participation of super-*
oxide anion in the intestinal tryptophan 2,3 -
dioxygenase reaction.
J. BIOL. CHEM., 246 : 7825 - 7826, 1971.
- H. HOEHN, E.M. BRYANT, P. JOHNSTON, T.H. NORWOOD et G.M. MARTIN.
- *Non-selective isolation, stability and longevity of*
hybrids between normal human somatic cells.
NATURE, 258 : 608 - 610, 1975.
- M. HOFFMAN, J.B. STEVENS et A.P. AUTOR. - *Adaptation to hyperoxia*
in the neonatal rat : Kinetic parameters of the oxygen
mediated induction of lung superoxide dismutases, cata-
lase and glutathione peroxidase.
TOXICOLOGY., 16 : 215 - 225, 1980.
- J.J. HOLLAND, D. KOHNE et M.V. DOYLE. - *Analysis of virus repli-*
cation in ageing human fibroblasts cultures.
NATURE, 245 : 316, 1973.

- R. HOLLIDAY et G.M. TARRANT. - *Altered enzymes in ageing human fibroblasts.*
NATURE, 238 : 26 - 30, 1972.
- R. HOLLIDAY, J.S. PORTEFIELD et D.D. GIBBS. - *Premature ageing and occurrence of altered enzyme in Werner's syndrome fibroblasts.*
NATURE., 248 : 762 - 763, 1974.
- A. HOUBEN et J. REMACLE. - *Lysosomal and mitochondrial heat labile enzymes in ageing human fibroblasts.*
- NATURE, 275 : 59 - 60, 1978.
- A. HOUBEN, A. HOUBION et J. REMACLE. - *Lysosomal and mitochondrial heat labile enzymes in Werner's syndrome fibroblasts.*
EXP. GERONTOL., 15 : 629 - 631, 1980.
- A. HOUBEN. - *Modifications enzymatiques au cours du vieillissement des cellules en culture - Mise en évidence du mécanisme d'altération de la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase. Thèse.*
FACULTES UNIVERSITAIRES NDLP - NAMUR, p 163, 1981.
- R.I. JENNRICH et P.F. SAMPSON. - *Application of stepwise Regression to Non-Linear Estimation.*
TECHNOMETRICS., 10 : 63 - 72, 1968.
- P.C. JOCELYN. - *Biochemistry of the thiol group.*
ACADEMIC PRESS, LONDON, 1972.
- H. JOENJE, R.R. FRANTS, F. ARWERT et A.W. ERIKSSON. - *Specific activity of human erythrocyte superoxide dismutase as a function of donor age. A brief note.*
MECH. AGE. DEV., 8 : 265 - 267, 1978.

- A. KAHN, A. GUILLOUZO, M.P. LEIBOVITCH, D. COTTREAU, M. BOUREL
et J-C. DREYFUS. - Heat lability of glucose - 6 - phosphate dehydrogenase in some senescent human cultured cells.
Evidence for its postsynthetic nature.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 77 : 760 - 766, 1977 a.
- A. KAHN, A. GUILLOUZO, D. COTTREAU, J. MARIE, M. BOUREL, P. BOIVIN
et J-C. DREYFUS. - Accuracy of protein synthesis and in vitro aging. Search for altered enzymes in senescent cultured cells from Human livers.
GERONTOLOGY. 23 : 174 - 184, 1977 b.
- M.S. KANUNGO. - Biochemistry of ageing.
ACADEMIC PRESS, LONDON - NEW YORK - TORONTO - SIDNEY -
SAN FRANCISCO, 281 pp, 1980.
- R.C. KARN, J.D. SHULKIN, A.D. MERRITT, R.C. NEWELL - Evidence for
post-transcriptional modification of human salivary
amylase (amy₁) isozymes.
BIOCHEM. GENET. 10 : 341 - 350, 1973.
- C.L. KEEN, B. LÖNNERDAL, T.N. STEIN et L.S. HURLEY. - Superoxide
dismutase isoenzymes in Bovine and Human milk.
BIOL. TRACE. ELEM. RES., 2 : 221 - 227, 1980.
- E.W. KELLOGG et I. FRIDOVICH. - Superoxide, hydrogen peroxide,
and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine
oxidase system.
J. BIOL. CHEM., 250 : 8812 - 8817, 1975.
- E.W. KELLOGG et I. FRIDOVICH. - Superoxide dismutase in the rat
and mouse as a function of age and longevity.
J. GERONTOL., 31 : 405 - 408, 1976.

- E.W. KELLOGG et I. FRIDOVICH. - *Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically-generated superoxide and hydrogen peroxide.*
J. BIOL. CHEM., 252 : 6721 - 6728, 1977.
- R.E. KIMBALL, K. REDDY, T.H. PEIRCE, L.W. SCHWARTZ, M.G. MUSTAFA et C.E. CROSS. - *Oxygen toxicity : augmentation of antioxidant defense mechanisms in rat lung.*
AM. J. PHYSIOL., 230 : 1425 - 1431, 1976.
- D. KLUG, J. RABANI et I. FRIDOVICH. - *A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis.*
J. BIOL. CHEM., 247 : 4839 - 4842, 1972.
- H. KONEFF, MITT. NATURFORSCH. GES. 44 : 13, 1886 cité dans BOURNE op. cit.
- N.S. KOSOWER et E.M. KOSOWER. - *The glutathione-glutathione disulfide system.*
dans : *Free radicals in Biology.*
ED : W.A. PRYOR
ACADEMIC PRESS. NEW YORK, 2 : 55 - 84, 1976.
- J.F. KOSTER, R.G. SLEE et TH.J.C. VAN BERKEL. - *A study on human superoxide dismutase in human tissue : Amount and isoenzyme pattern, in connection to lipofuscin.*
dans : *Biological and clinical aspects of superoxide and superoxide dismutase.*
EDS : W.H. BANNISTER and J.V. BANNISTER.
ELSEVIER/NORTH-HOLLAND, 11 B : 294 - 303, 1980.
- A.A. KRASNOVSKY et V.E. KAGAN. - *Photosensitization and quenching of singlet oxygen by pigments and lipids of photo-receptor cells of the retina.*
FEBS LETTERS, 108 : 152 - 154, 1979.

- R.P. KUMAR, S.D. RAVINDRANATH, C.S. VAIDYANATHAN et N.A. RAO.
- Mechanism of hydroxylation of aromatic compounds :
II. Evidence for the involvement of superoxide anions
in enzymatic Hydroxylations.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 49 : 1422 - 1426, 1972.
- D.I. KURTZ. - The effect of ageing on *in vitro* fidelity of translation in mouse liver.
BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA., 407 : 479 - 484, 1975.
- F. LAVELLE, A.M. MICHELSON et L. DIMITREJEVIC. - Biological protection by superoxide dismutase.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 55 : 350 - 357, 1973.
- B.E. LEIBOVITZ, B.V. SIEGEL. - Aspects of free radicals reactions in biological systems : Aging.
J. GERONTOL., 35 : 45 - 56, 1980.
- G. LERAY, L. GUENET, A. LE TREUT et J.Y. LE GALL. - Age-related decrease in lysosomal β -D-galactosidase activity of human liver cell lines : argument against post-translational modifications.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 100 : 1491 - 1496, 1981.
- C.M. LEWIS et G.M. TARRANT. - Error theory and ageing in human diploid fibroblasts.
NATURE, 239 : 316 - 318, 1972.
- S. LINN, M. KAIRIS et R. HOLLIDAY. - Decreased fidelity of DNA polymerase activity isolated from aging human fibroblasts.
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 73 : 2818 - 2822, 1976.
- B. LÖNNERDAL, C.L. KEEN et L.S. HURLEY. - Isoelectric focusing of superoxide dismutase isoenzymes.
FEBS. LETTERS., 108 : 51 - 55, 1979.

- O.H. LOWRY, N.J. ROSENBROUGH, L.A. FARR et R.J. RANDALL.
- Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. BIOL. CHEM., 193 : 265 - 275, 1951.
- P.B. MC CAY, D.D. GIBSON, K.L. FONG et K.R. HORNBROOK. - Effect
of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation
in biological membranes.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 431 : 459 - 468, 1976.
- G.J. MC CLUNE et J.A. FEE. - Stopped flow spectrophotometric
observation of superoxide dismutation in aqueous
solution.
FEBS LETTERS., 67 : 294 - 298, 1976.
- J.M. MC CORD et I. FRIDOVICH. - The reduction of cytochrome c
by milk xanthine oxidase.
J. BIOL. CHEM., 243 : 5753 - 5760, 1968.
- J.M. MC CORD et I. FRIDOVICH. - Superoxide dismutase, an enzymic
function for erythrocuprein (Hemocuprein)
J. BIOL. CHEM., 244 : 6049 - 6055, 1969 a.
- J.M. MC CORD et I. FRIDOVICH. - The utility of superoxide dis-
mutase in studying free radical reactions. I.
Radicals generated by the interaction of sulfite,
dimethyl sulfoxide, and oxygen.
J. BIOL. CHEM., 244 : 6056 - 6063, 1969 b.
- J.M. MC CORD et I. FRIDOVICH. - The utility of superoxide dis-
mutase in studying free radical reactions. II.
The mechanism of the mediation of cytochrome c
reduction by a variety of electron carriers.
J. BIOL. CHEM., 1374 - 1377, 1970.

- J.M. MC CORD, B.B. KEELE Jr. et I. FRIDOVICH. - *An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis : The physiological function of superoxide dismutase.*
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 68 : 1024 - 1027, 1971.
- J.M. MC CORD. - *Free radicals and inflammation : protection of synovial fluid by superoxide dismutase.*
SCIENCE., 185 : 529 - 531, 1974.
- J.M. MC CORD et I. FRIDOVICH. - *Superoxide dismutases : A history.*
dans : *Superoxide and superoxide dismutases.*
EDS : A.M. MICHELSON, J.M. MC CORD et I. FRIDOVICH.
ACADEMIC PRESS, LONDON - NEW YORK - SAN FRANCISCO,
1 - 10, 1977.
- J.M. MC CORD. - *Superoxide , superoxide dismutase and oxygen toxicity.*
dans : *Reviews in biochemical toxicology I.*
EDS : HODSON, BEND et PHILPOT.
ELSEVIER/NORTH-HOLLAND. 109 - 124, 1979 a.
- J.M. MC CORD. - *Superoxide dismutases : Occurrence, Structure, Function and Evolution.*
dans : *Isozymes : Current Topics in Biological and Medical Research.*
ED : A.R. LISS.
VOL. 3 : 1 - 21, 1979 b.
- A. MACIEIRA-COELHO, C. DIATLOFF et E. MALAISE. - *Doubling potential of fibroblasts from different species after ionising radiation.*
NATURE, 261 : 586 - 588, 1976.
- T. MANN et D. KEILIN. - *Haemocuprein and hepatocuprein copper protein compounds of blood and liver in mammals.*
PROC. ROY. SOC. SER. B. BIOL. SCI., 126 : 303 - 315, 1939.

- D. MARIOTTI et R. RUSCITTO. - Age-related changes of accuracy and efficiency of protein synthesis machinery in rat.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 475 : 96 - 102, 1977.
- S. MARKLUND, G. BECKMAN et T. STIGBRAND. - A comparison between the common type and a rare genetic variant of Human Cupro-zinc superoxide dismutase .
EUR. J. BIOCHEM., 65 : 415 - 422, 1976.
- S. MARKLUND, I. NORDENSSON et O. BÄCK. - Normal Cu Zn Superoxide dismutase, Mn Superoxide dismutase, Catalase and glutathione peroxidase in Werner's syndrome.
J. GERONTOL., 36 : 405 - 409, 1981.
- H. MARKOWITZ, G. CARTWRIGHT et M. WINTROBE. - Studies on copper metabolism. XXVII. The isolation and properties of an erythrocyte cuproprotein (erythrocuprein).
J. BIOL. CHEM., 243 : 40 - 46, 1959.
- G.M. MARTIN, A. CURTIS, B.S. SPRAGUE et C.J. EPSTEIN. - Replicative life-span of cultivated human cells.
LAB. INVEST., 23 : 86 - 92, 1970.
- J.P. MARTIN et I. FRIDOVICH. - Evidence for a naturel gene transfer from the Ponyfish to its Bioluminescent bacterial symbiont *Photobacter leiognathi*.
J. BIOL. CHEM., 256 : 6080 - 6089, 1981.
- V. MASSEY, S. STRICKLAND, S.G. MAYHEW, L.G. HOWELL, P.C. ENGEL, R.G. MATTHEWS, M. SCHUMAN et P.A. SULLIVAN. - The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 36 : 891 - 897, 1969.

- H.R. MASSIE, V.R. AIELLO et A.A. IODICE. - Changes with age in copper and Superoxide dismutase levels in brains of C 57 BL/6J Mice.
MECH. AGE. DEV., 10 : 93 - 99, 1979.
- H.R. MASSIE, T.R. WILLIAMS et V.R. AIELLO. - Superoxide dismutase activity in two different wild-type strains of *Drosophila melanogaster*.
GERONTOLOGY, 27 : 205 - 208, 1981.
- J.F. MEAD. - Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes.
dans : Free radicals in Biology.
ED : W. PRYOR.
ACADEMIC PRESS., 1 : 51 - 67, 1976.
- F. MENNECIER et J-C. DREYFUS. - Molecular aging of fructose biphosphate aldolase in tissues of rabbit and man.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 364 : 320 - 326, 1974.
- A.M. MICHELSON et M.E. BUCKINGHAM. - Effects of superoxide radicals on myoblast growth and differentiation.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 58 : 1079 - 1086, 1974.
- H.P. MISRA et I. FRIDOVICH. - The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins.
J. BIOL. CHEM. 246 : 6886 - 6890, 1971.
- H.P. MISRA et I. FRIDOVICH. - The Generation of superoxide radical during the autoxidation of Hemoglobin.
J. BIOL. CHEM., 247 : 6960 - 6962, 1972.
- H.P. MISRA. - Generation of superoxide radical during the autoxidation of thiols.
J. BIOL. CHEM., 249 : 2151 - 2155, 1974.

- M.S. MOHAMED et D.M. GREENBERG. - Isolation of purified copper protein from horse liver.
J. GEN. PHYSIOL., 37 : 433 - 439, 1953.
- A.R. MORGAN, R.L. CONE et T.M. ELGERT. - The mechanism of DNA strand breakage by vitamin C and superoxide and the protective roles of catalase and superoxide dismutase.
NUCLEIC ACIDS RES., 3 : 1139 - 1149, 1976.
- N. MORI, D. MIZUNO, S. GOTO. - Conservation of ribosomal fidelity during ageing.
MECH. AGE. DEV., 10 : 379 - 398, 1979.
- D.J. MORRE, L.M. MERLIN et T.W. KEENAM. - Localization of glycosyl transferase activities in a Golgi apparatus-rich fraction isolated from rat liver.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 37 : 813 - 819, 1969.
- V. MURRAY. - Properties of DNA polymerases from young and ageing human fibroblasts.
MECH. AGE. DEV., 16 : 327 - 343, 1981.
- M. NISHIKIMI, N.A. RAO et K. YAGI. - The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 46 : 847 - 853, 1972.
- M. NISHIKIMI et K. YAGI. - Oxidations of ascorbic acid and α -Tocopherol by superoxide.
dans : *Biochemical and medical aspects of active oxygen.*
EDS : O. HAYAISHI et K. ASADA.
UNIVERSITY PARK PRESS, 79 - 87, 1977.
- H. NOHL et D. HEGNER. - Do mitochondria produce oxygen radical *in vivo*?
EUR. J. BIOCHEM., 82 : 563 - 567, 1978.

- H. NOHL, D. HEGNER et K.H. SUMMER. - Responses of mitochondrial superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities to aging.
MECH. AGE. DEV., 11 : 145 - 151, 1979.
- H. NOHL, W. JORDAN et D. HEGNER. - Identification of free hydroxyl radicals in respiring rat heart mitochondria by spin trapping with the nitron DMPO.
FEBS LETTERS, 123 : 241 - 244, 1981.
- C. OHRLOFF, G. LANGE et O. HOCKWIN. - Postsynthetic changes of glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) and glutathione reductase (EC 1.6.4.2) in the ageing bovine lens.
MECH. AGE. DEV., 14 : 453 - 458, 1980.
- L.E. ORGEL. - The maintenance of the accuracy of Protein synthesis and its relevance to ageing.
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 49 : 517 - 521, 1963.
- L.E. ORGEL. - The maintenance of the accuracy of Protein synthesis and its relevance to ageing.
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 67 : 1476, 1970.
- L.E. ORGEL. - Ageing of clones of mammalian cells.
NATURE, 243 : 441 - 445, 1973.
- W.H. ORME-JOHNSON et H. BEINERT. - On the formation of the superoxide anion radical during the reaction of reduced iron-sulfur proteins with oxygen.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 36 : 905 - 911, 1969.
- L. PACKER et J.R. SMITH. - Extension of the lifespan of cultured human Diploid cells by vitamin E.
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 71 : 4763 - 4767, 1974.

- L. PACKER et K. FUEHR. - Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells.
NATURE , 267 : 423 - 425, 1977.
- L.F. PANCHENKO, O.S. BRUSOV, A.M. GERASIMOV et T.D. LOKTAEVA.
- Intramitochondrial localization and release of rat liver superoxide dismutase.
FEBS. LETTERS, 55 : 84 - 87, 1975.
- D.F. PARSONS, G.A. WILLIAMS et B. CHANCE. - Characteristics of isolated and purified preparations of the outer membranes and inner membranes of mitochondria.
ANN. N.Y. ACAD. SCI., 137 : 643 - 666, 1966.
- S.E. PATTON, G.M. ROSEN et E.J. RAUCKMAN. - Superoxide production by purified hamster hepatic nuclei.
MOL. PHARMACOL., 18 : 588 - 593, 1980.
- C. PEETERS-JORIS, A.-M. VANDEVOORDE et P. BAUDHUIN. - Subcellular localization of superoxide dismutase in rat liver.
BIOCHEM. J., 150 : 31 - 39, 1975.
- W.R. PENDERGRASS, M.G. MARTIN et P. BORNSTEIN. - Evidence contrary to the protein error hypothesis ⁱⁿ *in vitro* senescence.
J. CELL. PHYSIOL., 87 : 3 - 13, 1976.
- M. PICK, J. RABANI, F. YOST et I. FRIDOVICH. - The catalytic mechanism of the manganese - containing superoxide dismutase of *Escherichia coli* studied by pulse radiolysis.
J. AM. CHEM. SOC., 96 : 7329 - 7332, 1974.
- Z.A. PLACER, L.L. CUSHMAN et B.C. JOHNSON. - Estimation of product of lipid peroxidation (Malonyl Dialdehyde) in Biochemical systems.
ANAL. BIOCHEM., 16 : 359 - 364, 1966.

- H. PORTER et J. FOLCH. - *Cerebrocuprein I. A copper-containing Protein isolated from brain.*
J. NEUROCHEM., 1 : 260 - 268, 1957.
- G.B. PRICE, S.P. MODAK et T. MAKINODAN. - *Age-associated changes in the DNA of mouse tissues.*
SCIENCE, 171 : 917 - 920, 1971.
- W.A. PRYOR. - *The role of free radicals reaction in biological systems.*
dans : Free radicals in Biology.
ED : W. PRYOR.
ACADEMIC PRESS, NEW YORK, 1 : 1 - 49, 1976.
- K. PUGET et A.M. MICHELSON. - *Isolation of a new copper - containing superoxide dismutase, bacteriocuprein.*
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 58 : 830 - 838, 1974.
- M. RAES, A. HOUBION et J. REMACLE. - *The purification of plasma membranes from WI- 38 fibroblasts. Effects of ageing on their composition.*
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 642 : 313 - 324, 1981.
- K.V. RAJAGOPALAN, I. FRIDOVICH et P. HANDLER. - *Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties.*
J. BIOL. CHEM., 237 : 922 - 928, 1962.
- K.V. RAJAGOPALAN et P. HANDLER. - *Hepatic aldehyde oxidase. II. differential inhibition of electron transfer to various electron acceptors.*
J. BIOL. CHEM., 239 : 2022 - 2026, 1964.
- B.K. RATHA et M.S. KANUNGO. - *Induction of particulate and soluble isoenzymes of Tyrosine aminotransferase by hydrocortisone in the liver of rats as a function of age.*
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 76 : 925 - 929, 1977.

S.D. RAVINDRANATH et I. FRIDOVICH. - Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast.

J. BIOL. CHEM. 250 : 6107 - 6112, 1975.

U. REISS et M. ROTHSTEIN. - Age-related changes in isocitrate lyase from the free living nematode *Turbatrix aceti*.

J. BIOL. CHEM., 250 : 826 - 830, 1975.

U. REISS et D. GERSHON. - Comparison of cytoplasmic superoxide dismutase in liver, heart and brain of aging rats and mice.

BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 73 : 255 - 262, 1976 a.

U. REISS et D. GERSHON. - Rat liver superoxide dismutase.

Purification and age-related modifications.

EUR. J. BIOCHEM., 63 : 617 - 623, 1976 b.

J. REMACLE. - Detection d'antigènes en microscopie électronique au moyen d'anticorps hybrides marqués à la ferritine. Application à la localisation du cytochrome b₅ sur les membranes subcellulaires.

UNIV. CATHOLIQUE DE LOUVAIN - LABORATOIRE DE CHIMIE PHYSIOLOGIQUE, 54 - 75, 1973.

J. REMACLE, A. HOUBION et A. HOUBEN. - Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts. Comparison between young and old cells.

BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 630 : 57 - 70, 1980.

J. REMACLE, A. HOUBEN, J P. LEBLON, M. SOMVILLE, F. MBEMBA, A.

HOUBION et M. RAES. - Evolution, plasticité et modifications des cellules au cours du vieillissement.

Effet de la vincamine sur le vieillissement cellulaire.

EDITION M.K. PARIS, 1 - 63, 1982.

- A.Z. REZNICK *et al.*, non publié, cité dans GERSHON 1979.
- A.Z. REZNICK, L. LAVIE, H. GERSHON *et* D. GERSHON. - Age-associated accumulation of altered FDP aldolase B in mice. Conditions of detection and determination of aldolase half-life in young and old animals. *FEBS LETTERS.*, 128 : 221 - 224, 1981.
- J.S. RICHARDSON, K.A. THOMAS, B.H. RUBIN *et* D.C. RICHARDSON.
- Cristal structure of bovine Cu, Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution : Chain tracing and metal ligands.
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 72 : 1349 -1353, 1975.
- A. ROBINSON. - Evolution and the distribution of glutaminy and asparaginy residues in proteins.
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 71 : 885 - 888, 1974.
- A. ROBINSON. - Molecular clocks, molecular profiles and optimum diets; three approaches to the problem of aging.
MECH. AGE. DEV., 9 : 225 - 236, 1979.
- S. ROSS *et* G. SCOTT, *BRIT. J. RADIOL.*, 12 : 440, 1939.
- M. ROTHSTEIN. - Aging and the alteration of enzymes : a review.
MECH. AGE. DEV., 4 : 325 - 338, 1975.
- M. ROTHSTEIN. - Recent developments in the age-related alteration of enzymes : a review.
MECH. AGE. DEV., 6 : 241 - 257, 1977.
- M. ROTHSTEIN. - The formation of altered enzymes in aging animals.
MECH. AGE. DEV., 9 : 197 - 202, 1979.

- M. ROTHSTEIN. - *Posttranslational alteration of proteins.*
dans : *Handbook of Biochemistry in aging.*
ED : J.R. FLORINI.
CRC PRESS, INC., BOCA RATON, FLORIDA
103 - 111, 1981.
- G. ROTILIO, R.C. BRAY et F.M. FIELDEN. - *A pulse radiolysis study of superoxide dismutase.*
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 268 : 605 - 609, 1972.
- M.B. ROTMAN. - *Partial loss of activity of individual molecules of aged β -galactosidase.*
dans : *The Lactose Operon.*
EDS : J.R. BECKWITH and D. ZIPSER.
COLD SPRING HARBOR LABORATORY, 279 - 289, 1970.
- G. ROUSER, G.J. NELSON, S. FLEICHER et G. SIMON. - *Lipid composition of animal cell membranes, organelles and organs.*
dans : *Biological membranes. Physical fact and function.*
ED : D. CHAPMAN.
ACADEMIC PRESS NEW YORK., 1 : 5 - 69, 1968.
- A.T.R. RUPNIAK et R.V. QUINCEY. - *Mechanism of action of a microsomal inhibitor of protein synthesis potentiated by GSSG.*
BIOCHEMICAL JOURNAL., 136 : 335 - 342, 1973.
- E. SAKSELA et P.S. MOORHEAD. - *Aneuploidy in the degenerative phase of serial cultivation of human cell strains.*
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 50 : 390 - 395, 1963.
- M.L. SALIN et J.M. MC CORD. - *Free radicals and inflammation : Protection of phagocytoring leukocytes by superoxide dismutase.*
J. CLIN. INVEST., 56 : 1319 - 1323, 1975.

- M.L. SALIN et J.M. MC CORD. - Free radicals in leukocyte metabolism and inflammation.
dans : *Superoxide and Superoxide Dismutases*.
EDS : A.M. MICHELSON, J.M. MC CORD et I. FRIDOVICH.
ACADEMIC PRESS, LONDON - NEW YORK - SAN FRANCISCO.
257 - 270, 1977.
- M.L. SALIN, E.D. DAY et J.D. CRAPO. - Isolation and characterization of a Manganese - containing superoxide dismutase from rat liver.
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 187 : 223 - 228, 1978.
- K.K. SANFORD, W.R. EARLE et G.D. LIKELY. - The growth *in vitro* of single isolated tissue cells.
J. NAT. CANCER INST., 9 : 229 - 246, 1948.
- S. SATO et J.I. HARRIS. - Superoxide dismutase from *Thermus aquaticus* - isolation and characterization of manganese and apoenzyme.
EUR. J. BIOCHEM., 73 : 373 - 381, 1977.
- S. SATO et K. NAKAZAWA. - Purification and properties of superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB8.
J. BIOCHEM. (TOKYO)., 83 : 1165 - 1171, 1978.
- E. SCHLITZER et A. FURLEMEIER. - Vincamin, ein alkaloid aus *Vinca minor* L.
HELV. CHIM. ACTA., 36 : 2017 - 2020, 1953.
- V. SHAKESPEARE et J.H. BUCHANAN. - Studies on phosphoglucose isomerase from cultured human fibroblasts : absence of detectable ageing effects on the enzyme.
J. CELL. PHYSIOL., 94 : 105 - 116, 1978.
- F. SHAPIRA, A. WEBER, A. GUILLOUZO et J.-C. DREYFUS.
dans : liver and aging - 1978.
ED : KENICHI KITANI.
ELSEVIER/NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL PRESS, 47 - 53, 1978.

- H.K. SHARMA, S.K. GUPTA et M. ROTHSTEIN. - Age-related alteration of enolase in the free-living nematode Turbatrix aceti.
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 174 : 324 - 332, 1976 a.
- H.K. SHARMA et M. ROTHSTEIN. - Age-related alteration of enolase from Turbatrix aceti.
FED. PROC. FED. AM. SOC. EXP. BIOL., 35 : 1405, 1976 b.
- H.K. SHARMA et M. ROTHSTEIN. - Serological evidence for the alteration of enolase during aging.
MECH. AGE. DEV., 8 : 341 - 354, 1978.
- H.K. SHARMA et M. ROTHSTEIN. - Altered enolase in aged Turbatrix aceti results from conformational changes in the enzyme.
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 77 : 5865 - 5868, 1980.
- G.S. SHIELDS, H. MARKOWITZ, W.H. KLASSEN, G.E. CARTWRIGHT et M.M. WINTROBE. - Studies on copper metabolism. XXXI. Erythrocyte copper.
J. CLIN. INVEST., 40 : 2007 - 2015, 1961.
- H. SIES et K.H. SUMMER. - Hydroperoxide - metabolizing enzymes in rat liver.
EUR. J. BIOCHEM., 57 : 503 - 512, 1975.
- M.A. SIMONYAN et R.M. NALBANDYAN. - Interaction of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from erythrocytes.
FEBS. LETTERS., 28 : 22 - 24, 1972.
- P.M. SINET. - SOD genes in humans : chromosome location and electrophoretic variants.
dans : Superoxide and Superoxide dismutase.
EDS : A.M. MICHELSON, J.M. MC CORD et I. FRIDOVICH.
ACADEMIC PRESS, LONDON - NEW YORK - SAN FRANCISCO.
459 - 465, 1977.

- F.M. SINEX. - *The mutation theory of aging*
dans : *Theoretical Aspects of aging.*
EDS : M. ROCKSTEIN, M.L. SUSSMAN et J. CHESKY.
ACADEMIC PRESS, INC. NEW YORK - SAN FRANCISCO - LONDON.,
23 - 31, 1974.
- M. SOMVILLE et J. REMACLE. - *Comparative study of Mitochondrial and cytoplasmic Superoxide Dismutase During Ageing of Human Fibroblasts in Culture.*
dans : *Biological and Clinical Aspects of Superoxide and superoxide Dismutase 11B.*
EDS : W.H. BANNISTER et J.V. BANNISTER.
ELSEVIER/NORTH-HOLLAND, 292 - 293, 1980.
- M. SOMVILLE et J. REMACLE. - *Modification of the cytoplasmic superoxide dismutase from human fibroblasts.*
ARCH. INT. PHYS. BIOCH., 89 : 879, 1981.
- S.K. SRIVASTAVA, Y.C. AWASTHI et E. BEUTLER. - *Useful agents for the study of GSH metabolism in erythrocytes : organic hydroperoxides.*
BIOCHEM. J., 139 : 289 - 295, 1974.
- H.M. STEINMAN et R.L. HILL. - *Sequence homologies among bacterial and mitochondrial superoxide dismutases.*
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 70 : 3725 - 3729, 1973.
- H.M. STEINMAN. - *The amino-acid sequence of mangano superoxide dismutase from Escherichia coli B.*
J. BIOL. CHEM., 253 : 8708 - 8720, 1978.
- C. STEVENS, M.J. GOLDBLATT et J.C. FREEDMAN. - *Lack of erythrocyte superoxide dismutase change during human senescence.*
MECH. AGE. DEV., 4 : 415 - 421, 1975.

- J.B. STEVENS, A.P. AUTOR. - *Oxygen-induced synthesis of superoxide dismutase and catalase in pulmonary macrophages of neonatal rats.*
LAB. INVEST., 37 : 470 - 478, 1977.
- B.L. STREHLER, D.D. MARK, A.S. MILDVAN et M.S. GEE. - *Rate and magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium.*
J. GERONTOL., 14 : 430 - 439, 1959.
- H.W. STROBEL et M.J. COON. - *Effect of superoxide generation and dismutation on hydroxylation reaction catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450.*
J. BIOL. CHEM., 246 : 7826 - 7829, 1971.
- L. SZILARD. - *A Theory of ageing.*
NATURE, 184 : 956 - 958, 1959 a.
- L. SZILARD. - *On the nature of aging process.*
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., 45 : 30 - 45, 1959 b.
- F.P. TALLY, H.R. GOLDIN, N.V. JACOBUS et S.L. GORBACK. - *Superoxide dismutase in anaerobic bacteria of clinical significance.*
INFECT. IMMUN., 16 : 20 - 25, 1977.
- Y.H. TAN, J. TISCHFIELD et F.H. RUDDLE. - *The linkage of genes for the human interferon-induced antiviral protein and indophenol oxidase-B traits to chromosome G-21.*
J. EXP. MED., 137 : 317 - 330, 1973.
- A.L. TAPPEL. - *Lipid peroxidation damage to cell components.*
FED. PROCEEDINGS., 32 : 1870 - 1874, 1973.
- A.L. TAPPEL, B. FLETCHER et D. DEAMER. - *Effect of antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging parameters in the mouse.*
J. GERONTOL., 28 : 415 - 424, 1974.

- H. TAUBE. - Mechanisms of oxidation with oxygen.
J. GEN. PHYSIOL., 49 : 29 - 52, 1965.
- M.J. THOMAS, K.S. MEHL et W.A. PRYOR. - The role of superoxide anion in the xanthine oxidase - induced autoxidation of linoleic acid.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 83 : 927 - 932, 1978.
- K.V.A. THOMPSON et R. HOLLIDAY. - Chromosomes changes during the *in vitro* ageing of MRC-5 human fibroblasts.
EXP. CELL. RES., 96 : 1 - 6, 1975.
- K.V.A. THOMPSON et R. HOLLIDAY. - The longevity of diploid and polyploid human fibroblasts.
EXP. CELL. RES., 112 : 281 - 287, 1978.
- R.J.W. TRUSCOTT et R.C. AUGUSTEYN. - Oxydative changes in human lens proteins during senile nuclear cataract formation.
BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA, 492 : 43 - 52, 1977.
- P. TULKENS, H. BEAUFAY et A. TROUET. - Analytical fractionation of homogenates from cultured rat embryo fibroblasts.
J. CELL. BIOL., 63 : 383 - 401, 1974.
- J.F. TURRENS et A. BOVERIS. - Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.
BIOCHEM. J., 191 : 421 - 527, 1980.
- D.D. TYLER. - Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver.
BIOCHEM. J., 147 : 493 - 504, 1975.
- J.J. VAN HEMMEN et W.J.A. MEULING. - Inactivation of biologically active DNA by γ -ray-induced superoxide radicals and their dismutation products singulet molecular oxygen and hydrogen peroxide.
BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA., 402 : 133 - 141, 1975.

- D. VESTERBERG. - *Isoelectric focusing of proteins in thin layers of polyacrylamide gel.*
SCIENCE TOOLS, 20 : 22 - 29, 1973.
- J.H. WAITE et M.L. TANZER. - *Cross-linking of macromolecules.*
dans : *Handbook of biochemistry in aging.*
ED : J.R. FLORINI.
CRC PRESS, INC. BOCA RATON, FLORIDA.,
195 - 219, 1981.
- W.J. WALLACE, J.C. MAXWELL et W.S. CAUGHEY. - *The mechanisms of hemoglobin autoxidation, evidence for proton-assisted nucleophilic displacement of superoxide by anions.*
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 57 : 1104 - 1110, 1974.
- R.A. WEISIGER et I. FRIDOVICH. - *Superoxide dismutase. Organelle specificity.*
J. BIOL. CHEM., 248 : 3582 - 3592, 1973 a.
- R.A. WEISIGER et I. FRIDOVICH. - *Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization.*
J. BIOL. CHEM., 248 : 4793 - 4796, 1973 b.
- U. WESER, E. BUNNENBERG, R. COMMACK, C. DJERASSI, L. FLOHE, G. THOMAS et W. VOELTER. - *A study on purified Bovine erythrocyte cytochrome c.*
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 243 : 203 - 213, 1971.
- N.G. WESTMAN et S.L. MARKLUND. - *Copper- and Zinc - containing superoxide dismutase and manganese - containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors.*
CANCER RES., 41 : 2962 - 2966, 1981.

- B. WIEDERANDERS, S. ANSORGE, P. BOHLEY, H. KIRSCHKE, J. LANGNER
et H. HANSON. - *The age dependence of intracellular proteolysis : changes of the substrate proteins.*
MECH. AGE. DEV., 8 : 355 - 362, 1978.
- P.D. WILSON. - *Enzyme patterns in young and old mouse liver and lungs.*
GERONTOLOGIA, 18 : 36 - 42, 1972.
- P.D. WILSON. - *Enzyme levels in animals of various ages.*
dans : *Handbook of biochemistry in aging*
ED : J.R. FLORINI.
- CRC PRESS, INC., BOCA RATON, FLORIDA.,
163 - 194, 1981.
- R.I. WOJTYK et S. GOLDSTEIN. - *Fidelity of protein synthesis does not decline during aging of cultured Human fibroblasts.*
J. CELL. PHYSIOL., 103 : 299 - 303, 1980.
- N. YAMANAKA et D. DEAMER. - *Superoxide dismutase activity in WI-38 cell cultures : Effects of age, Trypsinization and SV-40 transformation.*
PHYSIOL. CHEM. PHYS., 6 : 95 - 106, 1974.
- J.W. YANG D.S.H. LIU et A. RICHARDSON. - *Biochemical studies of chick Brain development and maturation : II. Alterations in the mechanisms of cell-free protein synthesis.*
MECH. AGE. DEV., 6 : 95 - 113, 1977.
- N-Y.J. YANG et I.D. DESAI. - *Glutathione peroxidase and vitamine E interrelationship.*
dans : *Tocopherol, oxygen and biomembranes.*
EDS : C. DE DUVE et O. HAYAISHI.
ELSEVIER/NORTH-HOLLAND, 233 - 245, 1978.

P. ZEELON, H. GERSHON et D. GERSHON. - *Inactive enzyme molecules in aging organisms. Nematodes fructose - 1,6 - diphosphate aldolase.*

BIOCHEMISTRY 13 : 1743 - 1750, 1973.

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

AGP	acides gras polyinsaturés
Asp	résidus aspartiques
Cd ²⁺	cadmium
CMR	carré moyen résiduel
Co ²⁺	cobalt
CRM	matériel à réaction croisée
Cu	cuivre
EDTA	acide éthylène diamine tetraacétique
Fe	fer
g	accélération de la pesanteur
g25-g26	génération 25 - génération 26
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
Hg ²⁺	mercure
His	résidu histidine
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
I.F.A.	inhibition de la formation d'adrénochrome
L.D. ₅₀	dose provoquant 50 % de mortalité ("lethal dose")
LDH	lactate déshydrogénase
LPF	lipofuscine
MDA	malondialdéhyde
Mn	manganèse
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NADP ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydée
O ₂	oxygène
O ₂ ^{•(-)}	radical superoxyde

$O_2^1 \Delta g$	oxygène singulet
$O_2^1 \Sigma g^+$	oxygène singulet
OH^\bullet	radical hydroxyle
pI	point isoélectrique
P.B.S.	tampon phosphate 10 mM - 0,15 M NaCl pH 7,4
r	coefficient de corrélation
ROH	hydroxyacides
ROO^\bullet	radicaux peroxydes
ROOH	hydroperoxydes
rpm	rotations par minute
s	écart-type
SDS	sodium dodécyl sulfate
Se	sélénium
SET	tampon sucrose 0,25 M, EDTA 2 mM et triéthanolaminohydrochloride 20 mM pH 9,0
SOD	superoxyde dismutase
TBA	acide-2-thiobarbiturique
TCA	acide trichloracétique
TEMED	tétraméthyléthylènediamine
α -Tocophérol	vitamine E
U.	unité d'activité
Zn	zinc

α

BUMP



0 0 2 7 4 3 6 9 6

*FT B03/1982/02

